

VERGLEICH DER  
PROTEINZUSAMMENSETZUNG  
ZIRKULIERENDER LYMPHOZYTEN  
BEI CHRONISCHER LYMPHATISCHER  
LEUKÄMIE UND IMMUNOZYTOM

Robert Zimmermann

*Des  
München  
1904*





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554815\\_0100](https://archive.org/details/IA41554815_0100)



Aus der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern  
der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns

VERGLEICH DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG  
ZIRKULIERENDER LYMPHOZYTEN BEI CHRONISCHER LYMPHATISCHER  
LEUKÄMIE UND IMMUNOZYTOM

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Robert Zimmermann  
aus  
München  
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. W. Siegert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.1984

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                                      | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. EINLEITUNG                                                                                                                                                        |       |
| I. Allgemeiner Teil: Maligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)                                                                                                              | 1     |
| 1. Zur Geschichte der Einteilung maligner NHL                                                                                                                        | 1     |
| 2. Gegenüberstellung der heute gebräuchlichsten Klassifikationen der malignen NHL                                                                                    | 3     |
| a) Die Klassifikationen von Rappaport und Lennert                                                                                                                    | 3     |
| b) Grundlegende Unterschiede                                                                                                                                         | 3     |
| II. Spezieller Teil: Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) und das lymphoplasmazytisch/lymphoplasmazytoide Immunozytom (LPI): Entitäten der Kiel Klassifikation | 9     |
| 1. Die CLL vom B-Zell-Typ (B-CLL)                                                                                                                                    | 9     |
| a) Histologische Befunde                                                                                                                                             | 9     |
| b) Der Lymphozyt der B-CLL                                                                                                                                           | 9     |
| c) Klinik, Prognose und Therapie                                                                                                                                     | 11    |
| 2. Das Immunozytom                                                                                                                                                   | 12    |
| a) Histologie                                                                                                                                                        | 13    |
| b) Die Zellen des LPI                                                                                                                                                | 13    |
| c) Klinik, Prognose und Therapie                                                                                                                                     | 14    |
| 3. Die Behandlung der B-CLL und des LPI in der Klassifikation von Rappaport                                                                                          | 16    |
| 4. Zusammenfassung                                                                                                                                                   | 16    |
| III. Ziele der vorliegenden Arbeit                                                                                                                                   | 18    |
| B. MATERIAL                                                                                                                                                          | 20    |
| C. METHODEN                                                                                                                                                          | 21    |
| 1. Die Auswahl der untersuchten Fälle                                                                                                                                | 21    |
| 2. Die Isolierung mononukleärer Zellen                                                                                                                               | 21    |
| 3. Die Separierung von B- und T-Lymphozyten                                                                                                                          | 24    |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. Probenaufbereitung für die Ampholینگel-Elektrophorese                | 26 |
| 5. Proteinbestimmung                                                    | 27 |
| a) Proteinfällung mit Trichloressigsäure                                | 28 |
| b) Proteinkonzentrationsmessung                                         | 28 |
| 6. Die 2-dimensionale Gelelektrophorese                                 | 29 |
| a) Prinzip der Auftrennung                                              | 29 |
| b) Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung in Ampholینگelen        | 30 |
| α) Herstellung der Ampholینگele                                         | 30 |
| β) Ampholینگel-Elektrophorese                                           | 31 |
| γ) Äquilibrierung                                                       | 33 |
| c) Zweite Dimension: SDS-Gradientengel-Elektrophorese                   | 34 |
| α) Herstellung der Gradientengele                                       | 35 |
| β) Durchführung der Gradientengel-Elektrophorese                        | 35 |
| γ) Färben und Trocknen der Gele                                         | 36 |
| D. ERGEBNISSE                                                           | 38 |
| 1. Die untersuchten Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen                     | 38 |
| a) Die Fälle von B-CLL                                                  | 39 |
| b) Die Fälle von LPI                                                    | 43 |
| c) Die Fälle mit anderen niedrig-malignen NHL                           | 46 |
| α) Lymphozytische NHL außer B-CLL und LPI                               | 47 |
| β) Zentrozytische NHL                                                   | 51 |
| γ) Zentroblastisch/zentrozytische NHL                                   | 51 |
| 2. Die Eigenschaften der angewendeten 2-dimensionalen Gelelektrophorese | 52 |
| a) Probenaufbereitung                                                   | 53 |
| b) Auftrennung                                                          | 54 |

|                                                                   | Seite |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| 3. Die Ergebnisse der 2-D Auftrennung der Proteine von NHL-Zellen | 58    |
| a) Der Vergleich der 2-D Proteinmuster von B-CLL- und LPI-Zellen  | 59    |
| b) Die 2-D Proteinmuster niedrig-maligner NHL außer B-CLL und LPI | 72    |
| c) Das 2-D Proteinmuster normaler Lymphozyten                     | 78    |
| d) Schlußfolgerungen                                              | 81    |
| E. DISKUSSION                                                     | 83    |
| F. ZUSAMMENFASSUNG                                                | 93    |
| G. LITERATURVERZEICHNIS                                           | 95    |
| H. ABKÜRZUNGEN                                                    | 108   |
| I. DANKSAGUNG                                                     | 110   |
| Lebenslauf                                                        |       |



## A. EINLEITUNG

### I. Allgemeiner Teil: Maligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Mit dem von Pathologen geprägten Begriff "Maligne Non-Hodgkin-Lymphome" (NHL) wird eine Gruppe von Erkrankungen bezeichnet, die ein gemeinsames Kennzeichen haben: Das Auftreten von Lymphknotentumoren aufgrund maligner Lymphzellproliferation, deren histologisches Bild von den Lymphknotenveränderungen des Morbus Hodgkin abgegrenzt werden muß. Diese Krankheitsgruppe erwies sich im Laufe ihrer Erforschung als außerordentlich heterogen. Daher versuchten zahlreiche Autoren, die NHL nach definierten Kriterien in eigenständige Entitäten zu unterteilen.

#### 1. Zur Geschichte der Einteilung maligner NHL

In der Geschichte der Einteilung der malignen NHL lassen sich bis heute drei Phasen unterscheiden. Die erste begann mit der Beschreibung maligner Lymphknotentumoren durch Hodgkin (32) und setzte sich u.a. mit den von Virchow gegebenen Definitionen Leukämie, Lymphosarkom und Lymphom fort (86,87). Sie fand ihren Abschluß mit der Beschreibung des histologischen Bildes der Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin) durch Sternberg und Reed (72,83).

In der zweiten Phase wurden weitere Lymphome und Leukämien mononukleärer Zellen definiert und gegen Morbus Hodgkin abgegrenzt. Den neuen Entitäten wurden charakteristische klinische und insbesondere morphologische Merkmale zugeordnet. Es wurden Lymphome beschrieben, bei denen die malignen Zellen die befallenen Lymphknoten diffus durchsetzen, und solche, bei denen neoplastische Follikel auftreten, die den normalen Keimzentren der lymphatischen Gewebe gleichen. Rappaport versuchte, mit der These, follikuläres und diffuses Wachstum seien

nur verschiedene Erscheinungsformen gleicher Lymphom-entitäten, Ordnung in die zunehmende Vielfalt zu bringen (71). Diese Phase schloß Rappaport 1966 vorläufig mit der Veröffentlichung einer bis heute anerkannten, morphologisch begründeten Klassifikation der malignen NHL ab (70).

Um 1970 begann die dritte Phase der Bemühungen um eine allgemein verbindliche Einteilung der NHL. Sie ist gekennzeichnet durch die Ergänzung der bisher zugrunde gelegten Kriterien Morphologie und Klinik durch immunologische und zytochemische Befunde. Wichtige Fortschritte bedeuteten v.a. die Abgrenzung der Monozyten von den lymphatischen Zellen (47) und die Entdeckung verschiedener Membranstrukturen bei B- und T-Zellen (3,4,5,8,68). Die beschriebenen zytochemischen und immunzytochemischen Befunde wurden in der Folge auch bei neoplastischen lymphatischen Zellen erhoben (1,67,76). Auf der Basis dieser und vieler anderer Untersuchungen wurden in schneller Folge zahlreiche Klassifikationen der malignen NHL veröffentlicht (6,22,23,27,51,53,55).

Da diese Einteilungen untereinander und besonders mit dem Schema von Rappaport nur teilweise deckungsgleich waren, traten zwischen den sich auf sie beziehenden Arbeitsgruppen und Kliniken erhebliche Verständigungsschwierigkeiten auf. Um diese zu beseitigen, erarbeitete eine internationale Expertengruppe unter der Leitung des National Cancer Institute der USA (NCI) eine "working formulation for clinical usage" (63) (siehe Tabelle IV). In der NCI-Studie wurde allerdings auf die Anwendung immunologischer Methoden verzichtet, weshalb sie nur als übergreifende Übersetzungshilfe breitere Anwendung finden dürfte.

## 2. Gegenüberstellung der heute gebräuchlichsten Klassifikationen der malignen NHL

### a) Die Klassifikationen von Rappaport und Lennert

Unter den bis heute vorgeschlagenen Klassifikationen haben die von Rappaport und die sogenannte Kiel-Klassifikation größere Verbreitung gefunden. Die Klassifikation von Rappaport (70) ist mit wenigen Ausnahmen noch heute im anglo-amerikanischen Raum in Gebrauch und liegt den meisten vorgelegten Studien zu Prognose und Therapie der malignen NHL zugrunde (Tabelle II).

Im Jahr 1974 wurde von dem neu gegründeten europäischen Lymphomklub ein Schema von Lennert et al. als "Kiel Classification" veröffentlicht (27). Die zugrunde gelegten Untersuchungen wurden weitergeführt (50,53) und fanden 1978 in der Zusammenstellung "Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease" ihren vorläufigen Abschluß (51,52,81). Deutsche Pathologen und Kliniker beziehen sich seither in der Regel auf diese Einteilung (Tabelle I).

### b) Grundlegende Unterschiede

Rappaports Schema und die Kiel Klassifikation weichen in einigen Punkten wesentlich voneinander ab. Rappaport beschränkte sich in seiner auf pathologisch-anatomischen Beschreibungen aufgebauten Klassifikation auf die NHL im strengen Sinn; d.h. Neoplasien lymphatischer Zellen, bei denen es nicht zur Entwicklung von Lymphknotentumoren kommt, werden nicht als NHL klassifiziert. Dies gilt vor allem für viele Fälle der CLL. Im Gegensatz dazu wurden und werden in die Kiel Klassifikation konsequent die neuesten Erkenntnisse verschiedener Disziplinen über das lymphatische System eingearbeitet. Das hat dazu geführt, daß der Begriff Non-Hodgkin-Lymphome erweitert wurde. Heute sind alle Malignome lymphatischer

Zellen in die Kiel Klassifikation aufgenommen worden, mit einer einzigen Ausnahme: Das medulläre Plasmazytom, die auf das Knochenmark begrenzte bösartige Erkrankung der Plasmazellen, ist dort nicht angeführt (51).

Rappaport unterscheidet innerhalb seiner NHL-Klassen die Wachstumsformen "nodular" und "diffuse" (70,71). Diese Trennung hat in der Kiel Klassifikation keine Entsprechung. Rappaports Gruppen der nodulär wachsenden Lymphome finden sich hier im wesentlichen in der Entität des zentroblastisch/zentrozytischen Lymphoms wieder. Unabhängig davon ist jedoch unumstritten, daß die Lymphome mit nodulärer bzw. follikulärer Architektur gegenüber den diffus wachsenden Lymphomen eine wesentlich günstigere Prognose haben (38,41,52,63).

Aufgrund vergleichender klinischer Verlaufsstudien läßt sich insgesamt feststellen, daß die Rappaport'schen Lymphomentitäten inhomogen sind und Tumoren mit teilweise beträchtlichen prognostischen Unterschieden umfassen (13,16,44,84). Einige Entitäten Lennerts bzw. Rappaports sind kaum in die jeweils andere Klassifikation übertragbar. Letzteres wird besonders deutlich bei der Analyse des zentrozytischen und des zentroblastisch/zentrozytischen Lymphoms der Kiel Klassifikation bzw. des diffusen gut differenzierten .. und des diffusen schlecht differenzierten lymphozytischen Lymphoms (DWDL und DPDL) von Rappaport (Tabelle III).

Tabelle I: Die modifizierte Kiel Klassifikation

(nach 51):

Abkürzungen

I. Low-grade malignancy

|                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------|------------|
| M.L. lymphocytic                                               | LC         |
| B-CLL                                                          | B-CLL      |
| T-CLL                                                          |            |
| Hairy-cell leukemia (?)                                        |            |
| Mycosis fungoides, Sezary's syndrome                           |            |
| T-zone lymphoma                                                |            |
| M.L. lymphoplasmacytic/lymphoplasmacytoid<br>(LP immunocytoma) | IC,<br>LPI |
| M.L. plasmacytic<br>(only extramedullary plasmacytoma)         |            |
| M.L. centrocytic                                               | CC         |
| M.L. centroblastic/centrocytic                                 | CB/CC      |
| follicular                                                     |            |
| follicular and diffuse                                         |            |
| diffuse                                                        |            |
| with and without sclerosis                                     |            |

II. High-grade malignancy

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| M.L. centroblastic                                            | CB |
| primary                                                       |    |
| secondary                                                     |    |
| M.L. lymphoblastic                                            | LB |
| B-lymphoblastic, Burkitt type<br>and others                   |    |
| T-lymphoblastic, convoluted-cell type<br>and others           |    |
| M.L. immunoblastic                                            | IB |
| with plasmablastic/plasmacytic<br>differentiation (B)         |    |
| without plasmablastic/plasmacytic<br>differentiation (B or T) |    |

M.L. = Malignant lymphoma

Tabelle II: Vergleich der Entitäten der Kiel Klassifikation mit Rappaports Äquivalenten (nach 51)

| Kiel Klassifikation          | Rappaport's Äquivalent                                                                                |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>Low-grade malignancy</u>  |                                                                                                       |
| M.L. LC<br>(CLL and others)  | M.L. DWDL                                                                                             |
| LPI                          | { M.L. lymphocytic type with<br>dysproteinemia<br>Lymphoproliferative diseases<br>with dysproteinemia |
| M.L. CC                      | M.L. { DWDL, DPDL<br>NWDL, NPDL                                                                       |
| M.L. CB/CC                   | M.L. { DWDL, DPDL,<br>NWDL, NPDL,<br>DHL (DM), NHL (NM)<br>DH, NH.                                    |
| <u>High-grade malignancy</u> |                                                                                                       |
| M.L. CB                      | M.L. { DH, NH<br>undifferentiated, N or D                                                             |
| M.L. LB                      | M.L. { undifferentiated<br>DPDL                                                                       |
| M.L. IB                      | M.L. DH                                                                                               |

Abkürzungen der Rappaport Klassifikation:

DWDL = Diffuse well differentiated lymphocytic  
 DPDL = Diffuse poorly differentiated lymphocytic  
 NWDL = Nodular well differentiated lymphocytic  
 NPDL = Nodular poorly differentiated lymphocytic  
 DHL (ML) = diffuse histiocytic lymphocytic (... mixed)  
 NHL (NM) = nodular histiocytic lymphocytic (... mixed)  
 DH = Diffuse histiocytic  
 NH = Nodular histiocytic

Die Abkürzungen der Kiel Klassifikation entsprechen der Tabelle I.

Tabelle III: Histopathologische Klassifikation der wichtigsten Lymphomentitäten: Korrelation der Kiel und der Rappaport Klassifikation (nach 44)

|               | CLL | IC  | CC | CB-CC | CB | IB | LB | *  | ** | *** | Σ   |
|---------------|-----|-----|----|-------|----|----|----|----|----|-----|-----|
| DWDL          | 87  | 74  | 12 | 6     | —  | 2  | 1  | —  | 18 | —   | 200 |
| DPDL          | —   | 5   | 13 | 2     | 6  | 10 | 25 | 1  | —  | —   | 62  |
| DLH (DM)      | 1   | 4   | 7  | 4     | 3  | 2  | 1  | 5  | 2  | —   | 29  |
| DH            | —   | —   | 3  | 1     | 31 | 26 | 1  | 4  | 2  | 1   | 69  |
| NPDL          | —   | 4   | 6  | 14    | 1  | —  | —  | —  | —  | —   | 25  |
| NLH (NM)      | —   | 4   | 5  | 29    | 4  | 2  | —  | 1  | 2  | 1   | 48  |
| NH            | —   | 1   | 1  | 6     | 17 | 2  | —  | —  | —  | —   | 27  |
| Special cases | 4   | 10  | —  | 1     | 1  | 5  | —  | —  | 5  | —   | 26  |
| Σ             | 92  | 102 | 47 | 63    | 63 | 49 | 28 | 11 | 29 | 2   | 486 |

- \* Malignant lymphomas of high-grade malignancy, unclassified
- \*\* Borderline cases of low-grade malignancy
- \*\*\* Borderline cases of high-grade malignancy

Tabelle IV: Vergleich der Entitäten der "Working formulation" mit den Äquivalenten der Kiel Klassifikation (nach NCI) (63)

Working formulation Äquivalente der  
Kiel Klassifikation

Low-grade malignancy

A. M.L.

small lymphocytic  
consistent with CLL  
plasmacytoid

LC, CLL  
LPI

B. M.L., follicular

Predominantly small cleaved cell  
diffuse areas  
sclerosis

C. M.L., follicular

Mixed, small cleaved and large cell  
diffuse areas  
sclerosis

CB/CC  
follicular  
diffuse

Tabelle IV, Teil 2:

| Working formulation                                                                                                      | Äquivalent der<br>Kiel Klassifikation                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <u>Intermediate-grade malignancy</u>                                                                                     |                                                                             |
| D. M.L., follicular<br>Predominantly large cell<br>diffuse areas<br>sclerosis                                            | CB/CC<br>follicular<br>diffuse                                              |
| E. M.L., diffuse<br>Small cleaved cell<br>sclerosis                                                                      | CC                                                                          |
| F. M.L., diffuse<br>Mixed, small and large cell<br>sclerosis<br>epitheloid cell component                                | {CB/CC, diffuse<br>LPI, polymorphic                                         |
| G. M.L., diffuse<br>Large cell<br>cleaved cell<br>noncleaved cell<br>sclerosis                                           | {CB/CC, diffuse<br>CC<br>CB                                                 |
| <u>High-grade malignancy</u>                                                                                             |                                                                             |
| H. M.L.<br>Large cell, immunoblastic<br>plasmacytoid<br>clear cell<br>polymorphous<br>epitheloid cell component          | IB<br><br>T-zone Lymphoma<br>IB with plasmacy-<br>toid differen-<br>tiation |
| I. M.L.<br>Lymphoblastic<br>convoluted cell<br>nonconvoluted cell                                                        | LB, convoluted<br>cell type<br>LB, unclassified                             |
| J. M.L.<br>Small noncleaved cell<br>Burkitt's<br>follicular areas                                                        | LB, Burkitt type,<br>others                                                 |
| Miscellaneous<br>Composite<br>Mycosis fungoides<br>Histiocytic<br>Extramedullary plasmacytoma<br>Unclassifiable<br>Other | Mycosis fungoides<br><br>M.L., plasmacytic                                  |

## II. Spezieller Teil: Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) und das lymphoplasmazytisch/lymphoplasmazytoide Immunozytom (LPI): Entitäten der Kiel Klassifikation

### 1. Die CLL vom B-Zell-Typ (B-CLL)

Die B-CLL wird meist an einem Blutaussstrich durch den Nachweis pathologisch vermehrter kleiner, reif erscheinender Lymphozyten diagnostiziert. Das Vorliegen einer leukämischen Verlaufsform wird heute jedoch ebensowenig wie die Infiltration des Knochenmarks mit malignen lymphatischen Zellen als entscheidende Voraussetzung zur Sicherung der Diagnose "Malignes Lymphom, lymphozytisch, B-CLL" im Sinne der Kiel Klassifikation angesehen. Die Diagnose stützt sich vielmehr in erster Linie auf die histologische Untersuchung eines befallenen Lymphknotens und die Identifizierung der typischen B-CLL-Zellen (52,81).

#### a) Histologische Befunde

Die Struktur der befallenen Lymphknoten ist bei der B-CLL fast völlig zerstört. Dabei bleibt die Kapsel identifizierbar, wird aber ebenso wie das umgebende Weichteilgewebe lymphozytär infiltriert. Den vorherrschenden Zelltyp (80 - 85 %) stellen kleine Lymphozyten, die etwas größer als normale Lymphozyten sind. Daneben treten obligatorisch zwei weitere Zellformen auf, die Lennert beschrieb und mit Prolymphozyt und Lymphoblast bezeichnete (48). Die Zahl (im Mittel aller Fälle 15 - 20 %) und die Verteilung dieser beiden Zellarten bestimmt auch die Subtypen der B-CLL. Plasmazellen und lymphoplasmazytoide Zellen treten nicht auf (52).

#### b) Der Lymphozyt der B-CLL

Die typischen Zellen der B-CLL sind kleine Lymphozyten mit immunologischen Kennzeichen der B-Zell-Reihe. Bei 50 - 95 % dieser Zellen lassen sich membrangebundene

Immunglobuline (SIg) nachweisen, meist die Typen IgM und / oder IgD, selten IgG oder IgA. Die leichten Ketten dieser Immunglobuline gehören entweder dem Typ  $\kappa$  oder dem Typ  $\lambda$  an, was zusammen mit anderen Befunden für die Monoklonalität der B-CLL-Zellen spricht. Zytoplasmatisches Immunglobulin (CIg) kann nicht nachgewiesen werden. Früher mitgeteilte Fälle von CLL mit positivem Nachweis von CIg werden heute der Entität Immunozytom zugerechnet (12,81,82). Die B-CLL-Lymphozyten tragen den IgG-Fc-Fragment-Rezeptor (IgG-FcR). Durch mit Fluoreszein markierte IgG-Aggregate läßt sich dieser auf nahezu allen Zellen zeigen (21). In unterschiedlicher Häufigkeit können Komplement-Rezeptoren (C3R) nachgewiesen werden, meist für das C3d-Fragment. In einem geringen Prozentsatz der Fälle sind die Zellen C3b- und C3d-Rezeptor positiv. Darüberhinaus exprimieren die B-CLL-Lymphozyten als typische B-Zell-Marker sowohl das Ia-like Antigen als auch im Gegensatz zu normalen Lymphozyten und anderen NHL-Zellen mit B-Charakteristika in sehr hoher Dichte den Mäuse-Erythrozyten-Rezeptor (81).

Neben diesen immunologischen Befunden sind auch Ergebnisse der Zytochemie und der Elektronenmikroskopie von Bedeutung. Während die PAS-Reaktion bei zirkulierenden B-CLL-Lymphozyten in bis zu 80 % der Fälle positive Granula zeigt, ist sie bei den B-CLL-Lymphozyten im Lymphknotenpräparat in aller Regel negativ, was dem fehlenden Nachweis von CIg (der Klasse IgM) entspricht und ebenfalls als Abgrenzung gegen das Immunozytom herangezogen wird. Bei der Untersuchung im Elektronenmikroskop imponieren die Zellen als reich an Ribosomen, aber arm an Ergastoplasma. Sie sind damit funktionell als nicht sekretorische Zellen anzusehen (50,52).

### c) Klinik, Prognose und Therapie

Bei der B-CLL liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung generell ein Knochenmarksbefall vor (29,52). In der für den Morbus Hodgkin aufgestellten und später auf die malignen NHL übertragenen Stadieneinteilung nach der Ann-Arbor-Konferenz (19,73) ergibt sich daraus für die B-CLL immer das Stadium IV. Daher erfolgt die Unterteilung in prognostisch differierende Stadien nach anderen Kriterien, die Rai aufgestellt hat (69).

Zu Prognose und Therapie niedrig-maligner lymphozytischer NHL liegen zahlreiche Mitteilungen vor, die sich jedoch meist auf die Entitäten der Rappaport'schen Klassifikation beziehen. Die heute geltende Definition der B-CLL im Sinne der Kiel Klassifikation wurde erst vor einigen Jahren gegeben, so daß bisher noch keine abgeschlossenen Verlaufs- und Therapiestudien vorgelegt werden konnten. Zippin et al. teilten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 44 % bei 839 CLL-Patienten mit (92). Einige dieser Fälle dürften jedoch heute nicht mehr als CLL klassifiziert werden. Subtypen der B-CLL und prognostische Daten wurden noch nicht korreliert. Nach dem derzeitigen Wissensstand dürfte die mittlere Überlebenszeit bei 4 bis 5 Jahren liegen. Heinz et al. berichteten vorläufig eine mediane Überlebenszeit von deutlich über 40 Monaten (29).

Für die Therapie der B-CLL gilt prinzipiell: So spät und so zurückhaltend wie möglich! (29,66) Eine Indikation zur Behandlung darf nur bei schneller Progredienz angenommen werden oder, falls definierte Komplikationen auftreten. Die Feststellung einer schnell progredienten Erkrankung basiert auf der Beobachtung der Lymphozyten-Anstiegsrate und der Größe von Lymphomen und der Milz und setzt eine Zunahme der zirkulierenden Lymphozyten oder der Lymphom- bzw. Milzgröße um mehr als 50 % innerhalb dreier Monate voraus. Als definierte therapiewür-

dige Befunde gelten außerdem Beschwerden des Patienten, verursacht durch einen Milztumor oder große Lymphome, Anämie ( $Hb < 10 \text{ g\%}$ ), autohämolytische Anämie, Thrombozytopenie (Thrombozyten  $< 100000/\mu\text{l}$ ) oder eine massiv ausgeprägte Leukozytose (Leukozyten  $> 150000/\mu\text{l}$ ) (29,34, 61). Ist eine Therapie notwendig, wird möglichst mild behandelt. Das Mittel der ersten Wahl ist das relativ lymphotrope und schonende Chlorambucil (CBL). Es wird nach dem Schema von Knospe et al. in einer Dosierung von insgesamt  $0,4 \text{ mg/kg KG}$ , verteilt auf drei Tage, mit fallenden Prednisolondosen ( $75-50-25 \text{ mg}$ ) kombiniert (28,40). Nach frühestens 14 Tagen wird der nächste Behandlungszyklus angeschlossen. Die CBL-Dosis wird um  $0,1 \text{ mg/kg}$  pro Zyklus erhöht, bis die gewünschte therapeutische Wirkung oder toxische Nebenwirkungen auftreten (34). Bei Unwirksamkeit dieser Behandlung gibt man Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon im COP-Schema (2). Bleibt auch diese Therapie erfolglos, müssen stärker wirksame Zytostatika eingesetzt werden.

## 2. Das Immunozytom

Waldenström beschrieb 1944 erstmals eine Krankheit, die durch eine Ausschüttung von Makroglobulinen in das Blut gekennzeichnet ist (88). Dieser Krankheit wurde in der Folgezeit als morphologische Grundlage eine gemischte Proliferation von lymphozytoiden und plasmazytoiden Zellen zugeordnet. Seit 1954 sind PAS-positive Einschlüsse im Zytoplasma und / oder Zellkern dieser Zellen bekannt (74). Sie wurden als IgM-Moleküle identifiziert (24). Sowohl für die lymphozytoiden als auch die plasmazytoiden Zellen konnte die B-Zell-Natur durch den Nachweis von membrangebundenen Immunglobulinen (SIg) der Klasse IgM gesichert werden (67). Die genannten Befunde wurden jedoch auch bei anderen NHL ohne Makroglobulinämie erhoben. Diese Tatsache führte zum Postulat einer neuen NHL-Entität "Low-grade m.L., lymphoplasma-

cytic/lymphoplasmacytoid (LP immunocytoma)" in der Kiel Klassifikation, die einen leukämischen oder nicht-leukämischen Verlauf, mit oder ohne Makroglobulinämie, nehmen kann (51). Sie soll im Folgenden beschrieben werden.

#### a) Histologie

Entscheidendes Kriterium dieser Lymphomgruppe ist das bunte Nebeneinander von lymphozytoiden Zellen, Blasten, Plasmoblasten und Plasmazellen in der Lymphknotenhistologie. Das Vorkommen von Plasmazellen grenzt das LPI von der CLL ab, während bei Plasmozytomen keine lymphozytoiden Zellen gefunden werden können. Die Morphologie der Plasmazellen und die Gesamtheit des Zellbildes sind die Grundlagen der vorgeschlagenen Differenzierung von drei Subtypen des LPI: 1.Lymphoplasmazytischer Typ, 2.Lymphoplasmazytoider Typ, 3.Polymorpher Typ (52,53). Nach einer neueren Mitteilung unterscheiden sich diese Subtypen auch klinisch und prognostisch (29). Fließende Übergänge scheinen zwischen dem polymorphen Typ und den cb/cc Lymphomen zu bestehen.

#### b) Die Zellen des LPI

Die Zellen des LPI besitzen B-Charakteristika. Membran-gebundene Immunglobuline (SIg) können in allen Fällen, d.h. bei Patienten mit u n d ohne Ausschüttung eines monoklonalen Immunglobulins in das Serum, dargestellt werden. Dabei dominieren die Klassen IgM oder IgM/IgD (67,81). In einem Teil der Immunozytome lassen sich die Zellen durch intrazytoplasmatische Immunglobuline (CIg) von B-CLL-Lymphozyten abgrenzen; dies gelingt jedoch keineswegs immer (81). Die PAS-Reaktion in den LPI-Zellen ist in etwa 70 % der Fälle positiv.

Weiterführende Untersuchungen der Kieler Lymphomgruppe an Geweben von LPI-Patienten ergaben, daß sich durch Extraktion mit Saline in 76 % (51/67) der Fälle und

durch Doppelsextraktion mit Saline und anschließend mit einem Detergentiengemisch in 95 % der Fälle (41/43) eine Erhöhung des im Gewebe gebundenen Immunglobulins nachweisen läßt. Die Zunahme von IgM überwog bei weitem (91 % bzw. 39/43). Bei CLL war der Gewebe-Ig-Gehalt dagegen seltener und dann auch nur in geringerem Ausmaß erhöht (80,81).

Die LPI-Zellen tragen in der Regel Komplementrezeptoren. Sie sind C3bR- und C3dR-positiv, selten C3bR-positiv und C3dR-negativ. Gelegentlich kann keine Komplement-Rezeptor-Aktivität nachgewiesen werden. Allein C3dR-positive Zellen, wie sie in der Mehrzahl der B-CLL-Fälle anzutreffen sind, scheinen nach den wenigen bisher zu dieser Frage durchgeführten Studien nicht vorzukommen. Der bei B-CLL typischerweise deutlich exprimierte Mäuse-Erythrozyten-Rezeptor ist nur schwach ausgeprägt (81). In morphologisch als LPI eingeordneten Fällen ohne PAS-Reaktivität und ohne Clg-Nachweis läßt sich die Diagnose durch den elektronenmikroskopischen Nachweis Ergastoplasmahaltiger Zellen sichern (50).

Zusammenfassend ist das Immunozytom als niedrig-malignes NHL definiert, das ein pleomorphes Zellbild mit sowohl sekretorischen als auch nicht-sekretorischen Zellen der B-Reihe entwickelt. Neben den häufigen IgM-Immunozytomen kommen auch IgG und IgA bildende Immunozytome vor. In ca. 25 % der Fälle ist eine monoklonale Gammopathie vorhanden. Für die anderen Immunozytome wird eine Sekretionsstörung der produzierten Immunglobuline postuliert (52).

### c) Klinik, Prognose und Therapie

Der klinische Verlauf des LPI unterscheidet sich in einigen Punkten von demjenigen der B-CLL. Während die CLL grundsätzlich mit einer Infiltration des Knochenmarks einhergeht, kann ein Knochenmarksbefall nur in

etwa 90 % der LPI-Fälle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bewiesen werden. Dagegen ist eine extranodale Ausbreitung der malignen Zellen bei Immunozytomen häufiger. In solchen Fällen sind bevorzugt die Haut, die Orbita, der Gastrointestinaltrakt und die Lunge befallen (29, 34,75). Die ausgeprägte Vergrößerung der Milz kann ebenfalls das klinische Bild beherrschen. Man spricht dann von einem "splenomegalen Immunozytom" (78,85). Auffällig ist in etwa 25 % eine monoklonale Gammopathie, in 3 % eine generalisierte Amyloidose.

Dementsprechende Ergebnisse erbringt nach erstmaliger Stellung der Diagnose die Stadieneinteilung nach der Ann-Arbor-Klassifikation (19). Das LPI liegt zu diesem Zeitpunkt in 90 % der Fälle als Erkrankung im Stadium IV vor (die CLL in 100 %, s.o.). Selten wird dieses Lymphom aber schon in den Stadien I, II oder III erfaßt (29).

In den Studien zu der Prognose von NHL, die auf der Klassifikation von Rappaport fußen, kommt das Immunozytom nicht als eigene Entität vor. Die vorläufigen Ergebnisse einer Studie der Kieler Lymphomgruppe mit 114 LPI-Patienten zeigten eine mediane Überlebenszeit von 33 Monaten. Die im Vergleich zu der B-CLL deutlich schlechtere Prognose geht mit einer höheren Inzidenz einer ausgeprägten Anämie oder bedeutsamer Allgemeiner-scheinungen nach der Ann-Arbor-Konferenz und mit schnellerem Lymphknotenwachstum einher (29).

Die Therapie des LPI hat das Erkrankungsstadium zu berücksichtigen. In den Stadien I und II gebührt der Strahlentherapie Vorrang. Dies gilt insbesondere für den Befall der Orbita (oculocutaner Typ des LPI). Bei ausgesprochener Milzvergrößerung ist die Splenektomie indiziert. In den Stadien III und IV ist die zytostatische Behandlung angebracht. Therapie der ersten Wahl ist dann das Schema nach Knospe et al. (40), bei Versagen das COP-Schema (2). Es gelten die gleichen Richtlinien wie für die B-CLL (29,33,34). Es sei deshalb auf den Abschnitt II.1.c) verwiesen.

### 3. Die Behandlung der B-CLL und des LPI in der Klassifikation von Rappaport

Die Klassifikation von Rappaport (70) verwendet die Begriffe CLL und Immunozytom nicht. Beide Lymphome finden sich in verschiedenen Klassen dieser Einteilung wieder (Tabelle III). Die CLL ohne bemerkenswerte Lymphknotenvergrößerung wird nicht als malignes Lymphom klassifiziert. Die übrigen Fälle werden vor allem in die Gruppe "M.L.DWDL" eingeordnet.

Non-Hodgkin-Lymphome mit dem histologischen Bild des LPI werden in Abhängigkeit von dem Vorliegen einer monoklonalen Gammopathie verschieden behandelt. Immunglobulin-sezernierende Immunozytome werden überwiegend als "Lymphoproliferative disease, lymphocytic with dysproteinemia" bezeichnet. Das LPI ohne Immunglobulin-Spike im Serum wird dagegen von Rappaport mehrheitlich als "M.L.DWDL" oder als "M.L.DPDL" klassifiziert (vgl. Tabelle II). Die übrigen LPI-Fälle tauchen in den verschiedensten Gruppen auf (44,60,65).

### 4. Zusammenfassung

Die Kiel Klassifikation in ihrer heutigen Form teilt die niedrig-malignen NHL in fünf Gruppen ein:

- M.L. lymphocytic
- M.L. lymphoplasmacytic/ -cytoid
- M.L. plasmacytic
- M.L. centrocytic
- M.L. centroblastic/centrocytic

Die Gruppe M.L. lymphocytic ist unterteilt in eigenständige Lymphomentitäten, von denen die CLL des B-Typs den Hauptteil der Fälle stellt. Die Gruppe M.L. lymphoplasmacytic/ -cytoid ist nicht in weitere Typen getrennt. Diese Entität trägt auch die Bezeichnung Immunozytom (LPI).

Die Abgrenzung des Immunozytoms von den anderen niedrig-malinen NHL, insbesondere von der B-CLL, fußt auf der Korrelation histologischer und klinischer Befunde einerseits und zytochemischer sowie immunologischer Ergebnisse andererseits. Das LPI wird heute definiert als gemischte Proliferation sekretorischer und nicht-sekretorischer Zellen mit Eigenschaften der B-Zell-Reihe (52). Erste Mitteilungen über den klinischen Verlauf und die Prognose rechtfertigen die postulierte Eigenständigkeit der Entität LPI (29).

Grundlage der Differentialdiagnose zwischen B-CLL und LPI ist die morphologische Begutachtung von Lymphknotenschnittpräparaten, welche im Regelfall die Abgrenzung des lymphozytoiden Zellbildes der B-CLL von der pleomorphen Histologie des LPI mit lymphozytoiden u n d plasmazytoiden Zellen erlaubt.

Zur Untermuerung der histopathologischen Diagnose stehen derzeit nur wenige Methoden mit eindeutigen Ergebnissen zur Verfügung:

1. Die Durchführung der PAS-Reaktion:

Globuläre PAS-positive Zytoplasmaeinschlüsse beweisen das LPI, ihr Fehlen schließt es jedoch nicht aus.

2. Die Immunperoxidase-methode zum Nachweis des CIg:  
CIg sichert die Diagnose LPI, ist aber ebenfalls nicht obligatorisch.

3. Die Elektronenmikroskopie:

Die Diagnose LPI ist an die Proliferation Ergastoplasma-reicher u n d -armer Zellen gebunden.

Weitere Untersuchungen wie z.B. die Spezifizierung der Komplement-Rezeptor-Subtypen können zusätzliche Informationen liefern. Sie sind jedoch noch nicht an ausreichend großen Fallzahlen durchgeführt worden, um diagnostische Aussagekraft zu besitzen.

### III. Ziele der vorliegenden Arbeit

Es ist das Ziel der vorliegenden Studie, einen Beitrag zur Abgrenzung des lymphoplasmazytisch/lymphoplasmazytoiden Immunozytoms (LPI) im Sinne der Kiel Klassifikation von der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Typ (B-CLL) zu leisten.

Es konnte bis heute gezeigt werden, daß sich die B-CLL und das LPI in ihrem klinischen Verlauf und ihrer Prognose unterscheiden (29,78,79). Die Differentialdiagnose stützt sich auf den in der Einleitung ausführlich beschriebenen Nachweis der Proliferation sekretorischer und nicht-sekretorischer Zellen bei LPI, während die neoplastischen Zellen der B-CLL ausnahmslos nicht zur Produktion sekretorischer Immunglobuline befähigt sind. Dieser Nachweis ist auch bei Ausschöpfung aller bekannten histologischen, zytochemischen und immunologischen Methoden nicht immer eindeutig zu erbringen. Eine Erweiterung der differentialdiagnostischen Möglichkeiten wäre daher wünschenswert.

Die Definition des LPI im Sinne der Kiel Klassifikation (52) geht zunächst von der Lymphknotenhistologie aus. Ähnliche morphologische Beobachtungen, wie sie Lennert und Mitarbeiter der Beschreibung des LPI zugrunde legten, haben mittlerweile auch in aktualisierte Fassungen der Rappaport'schen Klassifikation Eingang gefunden. Die Gruppen "M.L.DWDL" und "M.L.DPDL" wurden subklassifiziert in Lymphome "with .." und "without plasmacytoid features". Diese Unterteilung berücksichtigt jedoch weiterhin keine immunologischen Befunde (18,62,63). Die Autoren der Kiel Klassifikation haben das LPI durch den Nachweis erhöhter Gewebs-Immunglobulin-Spiegel und monoklonaler zytoplasmatischer Immunglobuline näher charakterisiert. Dennoch ist nach wie vor, insbesondere in Einzelfällen, umstritten, ob der plasmazytische bzw. plasmazytoide Anteil an der Morphologie des LPI als neoplastisch oder reaktiv zu interpretieren ist (39,43).

Zur Beantwortung dieser beiden Fragenkomplexe wäre es hilfreich, weitere Unterschiede zwischen den Zellen der B-CLL und des LPI zeigen zu können. Auf molekularer Ebene ist über die proliferierenden Zellen dieser Lymphome sehr wenig bekannt. Die Vermutung, daß insbesondere die Proteinzusammensetzung der malignen Zellen differiert, liegt nahe, wenn man bedenkt, daß die postulierte Fähigkeit zur Produktion sekretorischer Immunglobuline die LPI-Zellen biologisch eindeutig von B-CLL-Zellen abgrenzen würde. Früher bekannte Protein-Trennverfahren besaßen keine ausreichende Auflösung, um neue Unterschiede in der Gesamtproteinzusammensetzung dieser Zellen herauszuarbeiten. Deshalb wurde für diese Studie die von O'Farrell beschriebene zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet. Diese Technik verbindet eine Ampholingel-Elektrophorese mit einer SDS-Gradientengel-Elektrophorese und erbringt höchste Auflösung zellulärer Proteingemische in zwei Dimensionen (64).

Untersucht wurden maligne, in das Blut ausgeschwemmte Zellen des LPI und der B-CLL. In die Studie fanden daher nur Fälle mit leukämischer Verlaufsform Eingang. Diese Auswahl gewährleistet bei hoher Zahl und überwiegendem Anteil der malignen Zellen an den zirkulierenden Leukozyten, daß selektiv die Proteinzusammensetzung der neoplastischen Zellen erfaßt werden kann. Durch den 2-D Vergleich der Zellysate von LPI und B-CLL-Zellen war mit dem Nachweis neuer Proteine zu rechnen, die mit der jeweiligen Lymphom-Entität assoziiert werden können.

Um weitere Vergleiche anstellen zu können, wurden auch die Zellen einiger anderer niedrig-maligner NHL-Fälle sowie die Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen der Auftrennung unterzogen. Durch die Einbeziehung der mononukleären Zellen einer exstirpierten Milz einer Patientin mit splenomegalem Immunozytom in diese Arbeit wurde ausserdem der Vergleich zwischen dem 2-D Muster zirkulierender und gewebeständiger LPI-Zellen ermöglicht.

## B. MATERIAL

Heparinisierte Blutproben wurden von Priv.Doiz. Dr. W. Siegert, München und Dr. B. Emmerich, München, zur Verfügung gestellt.

Schafs-Erythrozyten waren ein Geschenk von Priv.Doiz. Dr. E. Thiel, München.

Ficoll-Isopaque und FCS stammten von Seromed, Biochrom, Berlin.

S1-Nuclease (E.C.Nr. 3.1.4.7) wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Die verwendeten MG-Marker und Bromphenolblau stammten von Biorad Laboratories, Richmond, USA.

Ampholine für die isoelektrische Fokussierung wurden von LKB, Stockholm, bezogen. Ampholytgemische anderer Herkunft können eine Abweichung des pH-Gradienten verursachen.

Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, Tris, SDS, Lysin,  $\beta$ -Mercaptoäthanol, Agarose und BSA kamen von Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

Alle übrigen Feinchemikalien stammten von Merck, Darmstadt.

## C. METHODEN

### 1. Die Auswahl der untersuchten Fälle

Die Mehrzahl der untersuchten Zellen stammte aus dem peripheren Blut von Patienten mit B-CLL oder LPI. Voraussetzung für die Aufnahme eines Falles in diese Studie war deshalb die Ausschwemmung maligner Zellen in das Blut. Aus Vergleichsgründen wurden zusätzlich die zirkulierenden mononukleären Zellen einiger Patienten mit anderen NHL sowie gesunder Kontrollpersonen untersucht. Ausgangsmaterial der Versuche waren jeweils 10 bis 25 ml am Tage der Verarbeitung entnommenen heparinisierten Venenblutes.

In einem Fall konnten Zellen aus Milzgewebe untersucht werden, die sofort nach der Exstirpation des Organs präpariert wurden. Es handelte sich um 50 g Gewebe einer ca. 2500 g schweren Milz, die von einer Patientin mit einem splenomegalen Immunozytom stammte.

### 2. Die Isolierung mononukleärer Zellen

Benötigte Lösungen:

1. Ficoll-Isopaque ( $d = 1,077 \text{ g/cm}^3$ ).

2. Phosphate-buffered saline (PbS)

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| A: NaCl                   | 8,0 g  |
| KCl                       | 0,2 g  |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 1,15 g |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 0,2 g  |

Aqua bidest. ad 800 ml.

B:  $\text{CaCl}_2$  0,1 g; Aqua bidest. ad 100 ml.

C:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  0,1 g; Aqua bidest. ad 100 ml.

Lösungen A, B, C getrennt herstellen, dann mischen.

Ergibt 1000 ml PbS (Volumenverhältnis A:B:C=8:1:1).

3.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83 % (w/v).

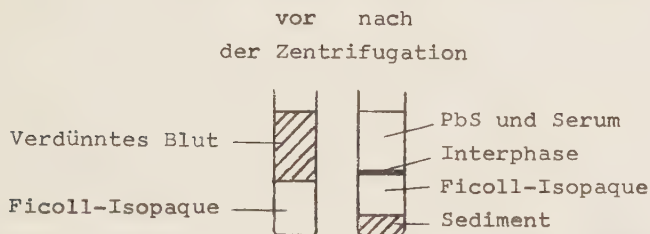
Die Milzgewebe-Stücke wurden mit einem Messer grob zerkleinert und etwa im Verhältnis 1:1 PbS zugegeben. Diese Mischung wurde einmal durch ein grobmaschiges, anschließend zweimal durch ein feinmaschiges Sieb passiert. Diese Arbeiten erfolgten bei 4°C in einem Kühlraum. Die resultierende Suspension wurde mit PbS verdünnt und dann gleich peripherem Blut weiterbehandelt, wie folgt:

Die mononukleären Zellen wurden über Ficoll-Isopaque isoliert. Ficoll-Isopaque enthält ein Jodkontrastmittel und makromolekulare Dextrane in einer Mischung, die eine isotone Lösung mit der Dichte 1,077 g/cm<sup>3</sup> ergibt. Das Prinzip der Trennung beruht auf dem unterschiedlichen spezifischen Gewicht menschlicher Blutzellen. Erythrozyten und die meisten Granulozyten haben eine Dichte von mehr als 1,077 g/cm<sup>3</sup>, das spezifische Gewicht von mononukleären Zellen, d.h. Lymphozyten, Monozyten und Blasten, aber auch das eines kleinen Teils der Granulozyten und das der Thrombozyten liegt unter diesem Wert (9,90).

Zunächst wurde aus der Leukozytenzahl und dem Differentialblutbild die Zahl der mononukleären Zellen pro ml Vollblut berechnet. Anhand dieses Wertes wurde das Blut mit PbS auf eine Konzentration von ca. 1,5 bis 2,0 x 10<sup>7</sup> mononukleären Zellen pro ml verdünnt. In Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 10 ml Ficoll-Isopaque pipettiert und vorsichtig 15 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Die Röhrchen wurden mit 400 x g für 30 Minuten bei 15°C zentrifugiert.

Im Sediment sammeln sich bei diesem Trennverfahren Erythrozyten und Granulozyten, in der Interphase v.a. Lymphozyten, Monozyten und Blasten (Abbildung 1). Die Fraktion der mononukleären Zellen ist aber noch durch die Thrombozyten, daneben durch einige Erythrozyten verunreinigt. Wird die oben angegebene Konzentration mononukleärer Zellen in der Blutverdünnung erhöht, so nimmt

Abbildung 1: Die Isolierung mononukleärer Zellen  
über Ficoll-Isopaque ( $d=1,077 \text{ g/cm}^3$ )



die Erythrozytenverunreinigung noch deutlich zu. Zur weiteren Reinigung der Interphase wurden Thrombozyten und Erythrozyten in hypotoner Ammoniumchloridlösung ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83 %) lysiert.

Die Interphase wurde dazu mit Pasteur-Pipetten abgenommen (wobei darauf zu achten ist, möglichst kein Ficoll-Isopaque mitaufzunehmen, welches die anschließenden Zentrifugationsschritte erheblich stört) und mit PbS etwa im Verhältnis 1:1 verdünnt. Diese Zellsuspension wurde mit  $950 \times g$  bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde mehrmals gewaschen, zunächst in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83 %, je nach makroskopischer Rötung zwei- bis dreimal, dann nach Lyse der Erythrozyten, zweimal in PbS. Zu jedem Waschvorgang wurde das Zellsediment resuspendiert, 3 Minuten in der entsprechenden Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit  $950 \times g$  für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Abschließend wurde die Zellzahl in der wieder isotonen Suspension bestimmt. Von der gut gemischten Aufschwemmung wurden Volumina mit jeweils ca.  $5 \times 10^7$  Zellen in Plastikgefäße pipettiert und hochtourig zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment wurde aufbereitet oder bei  $-40^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3. Die Separierung von B- und T-Lymphozyten

Benötigte Lösungen:

1. PbS
2.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83 % (w/v)
3. Fetales Kälberserum (FCS)
4. Ficoll-Isopaque ( $d = 1,077 \text{ g/cm}^3$ )

Für die Separierung von B- und T-Lymphozyten wurde die Fähigkeit der T-Lymphozyten genutzt, mit Schafs-Erythrozyten (SRBC) Rosetten zu bilden (81). Auf eine Vorbehandlung der SRBC wurde verzichtet, da vor allem eine reine T-Zell-Fraktion gesammelt werden sollte.

FCS wurde hitzeinaktiviert, dann mit einem Teil der SRBC versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurden die SRBC für 10 Minuten mit  $950 \times g$  bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die restlichen SRBC wurden dreimal jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PbS gewaschen und dann mit  $950 \times g$  10 Minuten lang abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschvorgang wurden sie in einer Konzentration von  $40 \times 10^6/\text{ml}$  in PbS resuspendiert.

Die zirkulierenden Lymphozyten gesunder Spender wurden, wie oben beschrieben, über Ficoll-Isopaque isoliert und gewaschen. Nach Abschluß der Isolierung wurden sie in dem gegen SRBC absorbierten FCS in einer Konzentration von  $5 \times 10^6/\text{ml}$  suspendiert.

Je 1 ml der SRBC-Suspension wurde zu 1 ml der Lymphozytensuspension gegeben. Es resultierte also eine Lösung, in der SRBC und menschliche Lymphozyten im Verhältnis 8 : 1 aufgeschwemmt waren. Dieses Gemisch stand 5 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ , dann wurde es mit  $200 \times g$  bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert und anschließend für 60 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Durch die niedertourige Zentrifugation und die Kühlung während der Inkubationszeit wird die Bildung der Rosetten beschleunigt.

Nach der einstündigen Inkubation wurden die Sedimente mit einer Pasteur-Pipette schonend resuspendiert. Von zwei Ansätzen wurden jeweils 200 Lymphozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Als Rosette wurde jeder Lymphozyt gewertet, an den 3 oder mehr SRBC gebunden waren. Die Ergebnisse wurden gemittelt. Durchschnittlich hatten während der Inkubation ca. 50 % der Lymphozyten Rosetten gebildet.

Die verschiedenen angesetzten Lymphozyten-SRBC-Suspensionen wurden vereinigt. Je 15 ml davon wurden vorsichtig in Zentrifugenröhrchen über 10 ml Ficoll-Isopaque pipettiert. Die Röhrchen wurden bei 15°C für 40 Minuten mit 400 x g zentrifugiert (siehe Abbildung 1). In dem entstehenden Sediment befinden sich die T-Lymphozyten, die Rosetten gebildet hatten, sowie die ungebundenen SRBC. Die Interphase enthält angereicherte B-Lymphozyten, daneben Monozyten und einige T-Lymphozyten.

Das Sediment wurde mehrmals für 5 Minuten bei Raumtemperatur in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83 % inkubiert, dazwischen jeweils mit 950 x g bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert, bis die enthaltenen Erythrozyten lysiert waren. Zuletzt wurde die T-Zell-Fraktion zweimal in PbS gewaschen. Die Interphase wurde dreimal in PbS aufgeschwemmt, dazwischen ebenfalls mit 950 x g bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde jeweils in frischer Lösung resuspendiert.

Nach Abschluß der Waschvorgänge wurden Volumina der B- bzw. T-Fraktion, die jeweils ca.  $5 \times 10^7$  Zellen in PbS enthielten, in Plastikgefäße pipettiert und hochtourig zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellsedimente wurden weiterverarbeitet oder bei -40°C aufbewahrt.

#### 4. Probenaufbereitung für die Ampholigel-Elektrophorese

Die zu untersuchenden Zellen wurden im nächsten Arbeitsgang in homogene Lysate überführt. Diese Zellysate sollen so viel gelöste Proteine und so wenig makromolekulare Nukleinsäuren wie möglich enthalten. Proteinaggregate und Nukleinsäure-Makromoleküle behindern die 2-dimensionale Gelelektrophorese erheblich (64). Durch Ultraschallbehandlung, enzymatischen Nukleinsäureabbau und Ultrazentrifugation wurden diese möglichen Störungsursachen umgangen.

Die hier verwendete Aufbereitungsmethode basiert auf der Beschreibung von O'Farrell (64). Die Technik des Nukleinsäureabbaus stammt von Zechel und Weber (91).

Benötigte Puffer und Lösungen:

##### 1. Aufbereitungspuffer (91):

|                          |      |    |
|--------------------------|------|----|
| Harnstoff                | 3    | g  |
| H <sub>2</sub> O         | 1800 | µl |
| SDS 20 % (w/v)           | 600  | µl |
| Lysin-HCl, 1.5 M, pH 3.8 | 100  | µl |
| HCl 1 M                  | 100  | µl |
| ZnCl <sub>2</sub> 0,2 M  | 60   | µl |

Dieser Puffer wird bei -40°C in Aliquots aufbewahrt. Die Endkonzentrationen betragen für SDS 2 % (w/v) und für Harnstoff 9,1 M.

##### 2. Lyse-Puffer (64):

|                          |     |         |
|--------------------------|-----|---------|
| Harnstoff                | 9,5 | M       |
| NP 40                    | 2   | % (w/v) |
| Ampholine                |     |         |
| des Bereichs pH 5 - 7    | 1,6 | % (w/v) |
| des Bereichs pH 3,5 - 10 | 0,4 | % (w/v) |
| β-Merkaptoäthanol        | 5   | % (w/v) |

Aliquots werden bei -40°C aufbewahrt.

3. S1-Nuclease (Herkunft: Boehringer Mannheim,  
E.C. Nr. 3.1.4.7)

$5 \times 10^2$  Units in: Glycerol 50 % (w/v), Na-acetat-  
Puffer pH 4.5 0,05 M,  $\text{ZnCl}_2$  0,1 mM, 1  $\mu\text{l}$ .

Einem Zellsediment von im Mittel  $5 \times 10^7$  Zellen wurden 200  $\mu\text{l}$  des Aufbereitungspuffers zupipettiert. Die Zellen wurden dadurch lysiert und hohe Mengen an Nukleinsäuremakromolekülen freigesetzt - das Lysat wurde hochviskös (Zurückziehen in die Pipette vermeiden! Mischen mit Glasspatel!). Die Probe wurde dreimal jeweils 5 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt (mit einem Branson Sonifier bei ca. 20 W), zwischendurch in einem Eiswasserbad gekühlt. Die Probe darf währenddessen nicht schäumen, da die Luftblasen Proteinaggregate tragen und der Beschallung entziehen können. Dann wurden 5  $\mu\text{l}$  S1-Nuclease (entsprechend 2500 Units) zum Abbau der Nukleinsäuren zugefügt und die Probe für 15 Minuten bei  $45^\circ\text{C}$  in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zusatz von 200  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer wurde das Lysat 60 Minuten bei  $30^\circ\text{C}$  mit  $100000 \times g$  ultrazentrifugiert, um noch ungelöste Proteinaggregate abzutrennen (Kontron Ultrazentrifuge, Beckmann Festwinkelrotor TFT 65.13). Der klare Überstand war bereit zur isoelektrischen Fokussierung. Er wurde abpipettiert und bei  $-40^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

##### 5. Proteinbestimmung

Vorversuche ergaben, daß 2-D Gele nur dann untereinander vergleichbar sind, wenn gleiche Proteinmengen aufgetragen werden. Probenauftragsmengen in Abhängigkeit von der Zellzahl liefern keine vergleichbaren Gele. Dies beruht vor allem auf der unterschiedlichen Größe der eingesetzten Zellen.

Daher fand eine Methode zur exakten Proteinbestimmung Anwendung, die eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure und die anschließende Proteinbestimmung nach Lowry et al. (54) kombiniert.

a) Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zu 1 ml  $H_2O$  kamen 10  $\mu$ l proteinhaltigen Lysates. Dann wurde 1 ml Trichloressigsäure (TCA) 50 % (w/v) zugefügt. Dieser Ansatz wurde mit einem Glasspatel gemischt und 10 Minuten bei 4°C inkubiert, dann 10 Minuten mit einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml NaOH 0,01 N gelöst (Testansatz).

b) Proteinkonzentrationsmessung

Benötigte Stammlösungen (bei 4°C aufzubewahren!):

1. Lösung A:  $Na_2CO_3$  20 g  
K-Na-Tartrat 0,2 g  
NaOH 0,1 N ad 1000 ml.
2. Lösung B:  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  250 mg,  $H_2O$  ad 50 ml.
3. Folin-Phenolreagenz.

Vor der Proteinkonzentrationsmessung wurden folgende Lösungen frisch hergestellt:

4. Lösung C: 50 Vol. Lösung A + 1 Vol. Lösung B
5. Verdünntes Folin-Phenolreagenz:  
1 Vol. Folin-Phenolreagenz + 2 Vol.  $H_2O$

Zu dem Testansatz (Protein in NaOH 0,01 N 1 ml, s.o.) kamen 5 ml Lösung C. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 0,5 ml verdünntes Folin-Phenolreagenz hinzugefügt und der Ansatz weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde in einem Eppendorf Photometer bei 578 nm die Exstinktion des Ansatzes gegen den Reagenzienleerwert (NaOH 0,01 N ohne Protein 1 ml + Lösung C 5 ml + verdünntes Folin-Phenolreagenz 0,5 ml) gemessen.

Als Standard dienten Lösungen von Rinderserumalbumin (BSA) in  $H_2O$ . Im Bereich von 10  $\mu$ g bis 100  $\mu$ g BSA pro Ansatz waren die Exstinktionswerte zur Konzentration direkt proportional. Als Lysatleerwerte wurden Aliquots von Aufbereitungs- und Lysepuffer, im Verhältnis 1:1 gemischt, nach TCA-Fällung gemessen.

## 6. Die 2-dimensionale Gelelektrophorese

### a) Prinzip der Auftrennung

Jedes Protein besitzt neben anderen Kennzeichen zwei biochemische Merkmale, die es näher charakterisieren: Den isoelektrischen Punkt und das Molekulargewicht.

Proteine weisen in den Seitenketten zahlreiche Gruppen auf, die durch Titration unter verschiedenen Bedingungen zu Kationen oder Anionen ionisierbar sind. Der Grad der Ionisation hängt von dem pH-Wert der Umgebung ab. Für jedes Protein gibt es einen pH-Wert, bei dem die Zahl positiver und negativer Ladungen gleich ist. Dieser Wert ist der isoelektrische Punkt (pI). Bei diesem pH-Wert hört das Protein auf, im elektrischen Feld zu wandern.

Ampholine (Herkunft: LKB) sind kommerziell erhältliche Gemische von Ampholyten mit niedrigem Molekulargewicht ( $MG < 1000$ ) und verschiedenen isoelektrischen Punkten. In Gelen bauen sie einen pH-Gradienten auf, wenn ein elektrisches Feld angelegt wird. Auf diesem Prinzip beruht die Ampholinel-Elektrophorese. Werden andere Proteine zugegeben, wandern sie in dem Feld bis zu der Stelle des Ampholinel, an der ihr pI mit dem pH-Wert übereinstimmt. Dort werden sie fixiert und angereichert.

Das zweite hier interessierende Charakteristikum eines Proteins ist das Molekulargewicht (MG). In herkömmlichen Elektrophoreseverfahren bestimmt neben dem MG auch die Ladung eines Proteins unter den jeweiligen Pufferbedingungen Geschwindigkeit und Richtung seiner Wanderung im elektrischen Feld. Erst seit der Einführung des anionischen Detergens SDS (Natrium-Dodecylsulfat), das an Proteine bindet und sie mit einer negativen Nettoladung versieht, kann die Gelelektrophorese zur exakten Bestimmung des MG eingesetzt werden (77,89).

Die Auftrennung von Proteinen in der Ampholigel-Elektrophorese und in der SDS-Gel-Elektrophorese sind, einzeln durchgeführt, Methoden mit hohem Auflösungsvermögen. Für komplexe Proteingemische ist ihre Trennkapazität jedoch zu schwach. O'Farrell beschrieb daher eine 2-dimensionale (2-D) Gelelektrophoresetechnik, in der beide Auftrennungsmethoden kombiniert sind (64).

b) Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung in Ampholingen

α) Herstellung der Ampholinge

Benötigte Lösungen und Ansätze (64):

1. Acrylamidgel-Ansatz mit 2 % Ampholinen:

|                                          |                |
|------------------------------------------|----------------|
| Harnstoff                                | 5,5 g          |
| Acrylamid 30 % (w/v) +                   |                |
| Bisacrylamid 1,6 % (w/v)                 | 1,3 ml         |
| NP 40 10 % (w/v)                         | 2,0 ml         |
| H <sub>2</sub> O                         | 2,0 ml         |
| Ampholine 40 % (w/v) Bereich pH 5 - 7    | 0,4 ml         |
| Ampholine 40 % (w/v) Bereich pH 3,5 - 10 | 0,1 ml         |
| Frisch ansetzen!                         | Ergibt 10,0 ml |

2. Gelüberlagerungs-Lösung:

Harnstoff 8 M in H<sub>2</sub>O (Aliquots in -40°C)

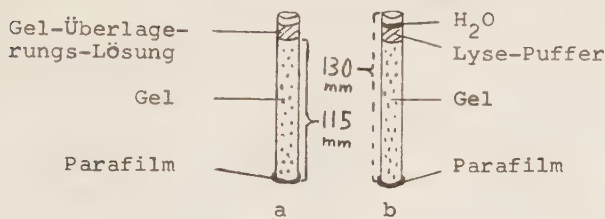
3. Lyse-Puffer (siehe Abschnitt C.4)

4. Ammoniumperoxidisulfat 10 % (w/v)

5. N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin (TEMED) 100 %

Die Ampholingele wurden in Glasröhrchen mit ca. 130 mm Länge und 2,5 mm Innendurchmesser hergestellt. Das untere Ende der Röhrchen wurde mit Parafilm verschlossen. Der Acrylamidgel-Ansatz wurde gerührt und leicht erwärmt, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hatte, dann wurden Ammoniumperoxidisulfat 10 % 10 µl und TEMED 10 µl hinzugefügt. Sofort nach der Zugabe von TEMED wurde das Gelmaterial bis zu der vorher markierten Höhe von 115 mm

Abbildung 2: Das Ampholingel während der Polymerisation



in die Glasröhrchen gefüllt. Dazu diente eine Plastikspritze mit Injektionsnadel, über die ein ca. 150 mm langer, dünner Plastikschauch gezogen war. Der Schlauch wurde in das Röhrchen eingeführt. Auf diese Weise ließ sich das Gelmaterial vom unteren Röhrchenende aus hochfüllen. Dieses Vorgehen ist notwendig, um die Bildung von Luftblasen während des Einfüllens zu vermeiden. Das Gelmaterial wurde mit 20 µl Gel-Überlagerungs-Lösung bedeckt (Abbildung 2.a), nach 1 bis 2 Stunden wurde diese entfernt und durch 20 µl Lyse-Puffer, überschichtet mit 10 µl H<sub>2</sub>O, ersetzt (Abbildung 2.b). Nach weiteren 1 bis 2 Stunden war die Polymerisation der Gele beendet.

### B) Ampholingel-Elektrophorese

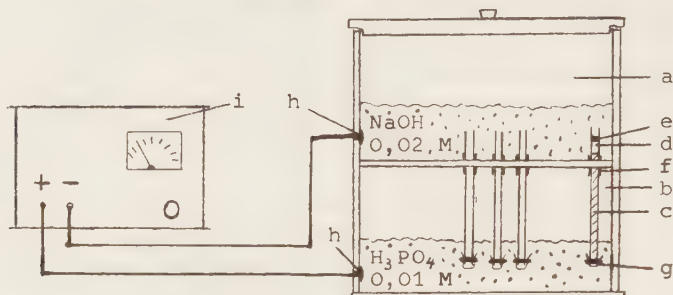
Benötigte Ansätze (64):

1. NaOH 0,02 M (Gründlich entgast!)
2. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M
3. Lyse-Puffer (siehe Abschnitt C.4)
4. Proben-Überlagerungs-Lösung (Aliquots in -40°C):
 

|                               |     |         |
|-------------------------------|-----|---------|
| Harnstoff                     | 9   | M       |
| Ampholine pH-Bereich 5 - 7    | 0,8 | % (w/v) |
| Ampholine pH-Bereich 3,5 - 10 | 0,2 | % (w/v) |

Nach Abschluß der Polymerisation des Ampholingels wurde der Parafilm entfernt. An seiner Stelle wurde das untere Ende des Gelröhrchens mit Dialyse-Membran verschlossen, die durch einen ca. 3 mm breiten Gummiring fixiert

Abbildung 3: Schematische Zeichnung des Ampholingel-Elektrophorese-Apparates



Erklärung: a = Obere Pufferkammer; b = Untere Pufferkammer; c = Ampholingel; d = Zellysat; e = Probenüberlagerungs-Lösung; f = Dichtung; g = Dialysemembran mit Gummiring; h = Elektrode; i = Spannungsgerät; + = Anode; - = Kathode.

wurde. Dabei war besonders zu beachten, daß zwischen Membran und Gel keine Luftblase zurückblieb. Deshalb wurde vor Auflegen der Membran ein Tropfen  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,01 M auf das Gel pipettiert. Die Röhrchen wurden senkrecht in einem Gelelektrophorese-Apparat angebracht, mit der Dialysemembran nach unten (Abbildung 3). Lyse-Puffer und  $\text{H}_2\text{O}$  wurden von der Geloberfläche entfernt und durch 20  $\mu\text{l}$  frischen Lyse-Puffer ersetzt. Die Röhrchen wurden dann mit NaOH 0,02 M aufgefüllt. Zuletzt kam  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,01 M in die untere und NaOH 0,02 M in die obere Pufferkammer. Beide Enden der Röhrchen standen in Puffer.

Jetzt wurden die Ampholingele nach folgendem Schema vor-elektrophoretisiert, um den pH-Gradienten auszubilden: 1. 200 V für 15 Min.; 2. 300 V für 30 Min.; 3. 400 V für 30 Min.

Nach Abschalten der Spannung wurde die obere Kammer geleert, NaOH und Lyse-Puffer aus dem oberen Röhrchenende

entfernt. Dann wurde das aufbereitete Zellysats aufgetragen, in Volumina zwischen 10 und 25  $\mu$ l, abhängig von dem Ergebnis der Proteinbestimmung. Darüber kamen 10  $\mu$ l Proben-Überlagerungs-Lösung und NaOH 0,02 M (Abbildung 3). Die obere Kammer wurde mit frischer NaOH 0,02 M gefüllt. Es folgte die Fokussierung nach dem Schema:

1. 400 V für 18 Stunden
2. 600 V für 1 Stunde

Daraus ergab sich ein Volt-Stunden-Produkt von 7800 Vxh. Keinesfalls wurden Grenzen von 7400 bzw. 8200 Vxh überschritten. Die Erhöhung der Spannung während der letzten Stunde bringt eine optimale Auftrennungsschärfe (64).

#### g) Äquilibration

Nach der Ampholigel-Elektrophorese wurden die Gele in SDS-Probenpuffer inkubiert. Dadurch konnten die Proteine die Bedingungen dieses Puffers annehmen und sich mit SDS beladen. Die Ampholine diffundieren währenddessen größtenteils aus dem Gel.

Benötigter Ansatz: SDS-Probenpuffer (64):

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Tris-HCl, 1 M, pH 6.8      | 5,0 ml  |
| SDS 10 % (w/v)             | 25,0 ml |
| $\beta$ -Mercaptoäthanol   | 2,5 ml  |
| Glycerol dist.             | 5,0 ml  |
| H <sub>2</sub> O           | 10,5 ml |
| Bromphenolblau 0,1 % (w/v) | 2,0 ml. |

Die Ampholingele wurden mit Hilfe einer wassergefüllten Plastikspritze vorsichtig aus den Röhrchen gedrückt und 30 Minuten bei Raumtemperatur in je 5 ml SDS-Probenpuffer gelegt. Nach der Äquilibration wurden die Gele sofort bei -40°C tiefgefroren oder die SDS-Gradientengel-Elektrophorese angeschlossen. Je länger die Gele bei Raumtemperatur in SDS-Probenpuffer liegen, desto mehr nimmt die Schärfe der Fokussierung ab und desto mehr niedermolekulare Proteine beginnen, aus dem Gel zu diffundieren.

c) Zweite Dimension: SDS-Gradientengel-Elektrophorese

Benötigte Ansätze und Lösungen (45,64):

1. Acrylamidstamm- } { Acrylamid 30,0 % (w/v)  
 lösung 30 %ig: } { Methylenbisacrylamid 0,8 % (w/v)
2. Acrylamidstamm- } { Acrylamid 60,0 % (w/v)  
 lösung 60 %ig: } { Methylenbisacrylamid 1,6 % (w/v)
3. Tris-HCl, 1 M, pH 8.8
4. Tris-HCl, 1 M, pH 6.8
5. SDS 10 % (w/v)
6. SDS 20 % (w/v)
7. N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin (TEMED) 100 %
8. Ammoniumperoxydisulfat 10 % (Frisch ansetzen!)
9. Ammoniumperoxydisulfat 1,5 % (Frisch ansetzen!)
10. Laufpuffer: Tris 30 g, Glycin 144 g,  
 SDS 20 % 5 ml, H<sub>2</sub>O ad 1000 ml.
11. Agarose 1 % in: SDS-Probenpuffer (C.6.b.γ.)  
 ohne Bromphenolblau.
12. Molekulargewichtsmarker:  
 Eichproteinlösung 50 % (v/v) in: SDS-Probenpuffer  
 (MG der Eichproteine siehe D.2.b).

Zusammensetzung der Gradientengel-Ansätze:

| Ansatz (Acrylamid in %)     | <u>A</u> (5%) | <u>B</u> (25%) |
|-----------------------------|---------------|----------------|
| Tris-HCl, 1 M, pH 8.8       | 7,5 ml        | 7,5 ml         |
| H <sub>2</sub> O            | 8,36 ml       | 3,75 ml        |
| SDS 10 %                    | 0,2 ml        | 0,2 ml         |
| Acrylamidstammlösung 30 %ig | 3,74 ml       | --             |
| Acrylamidstammlösung 60 %ig | --            | 8,4 ml         |

Zusammensetzung des Sammelgel-Ansatzes (3% Acrylamid):

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Tris-HCl, 1 M, pH 6.8       | 1,25 ml |
| H <sub>2</sub> O            | 7,6 ml  |
| SDS 20 %                    | 0,05 ml |
| Acrylamidstammlösung 30 %ig | 1,0 ml  |

Färbe- und Entfärbeebäder:

|                          | Färbebad    | Entfärbeebäder |           |
|--------------------------|-------------|----------------|-----------|
|                          |             | "stark"        | "schwach" |
| H <sub>2</sub> O         | 4,5 Vol.    | 4,5 Vol.       | 8,5 Vol.  |
| Methanol                 | 4,5 Vol.    | 4,5 Vol.       | 0,5 Vol.  |
| Eisessig                 | 1,0 Vol.    | 1,0 Vol.       | 1,0 Vol.  |
| Coomassie-<br>blau R 250 | 0,25 %(w/v) | ---            | ---       |

α) Herstellung der Gradientengele

Zur Herstellung der Plattengele wurden Glasplatten und Kunststoffleisten entsprechend den Erläuterungen von O'Farrell zusammengesetzt (64). Es ergaben sich die Innenmaße 146 mm Höhe, 134 mm Breite und 1,5 mm Tiefe. Die Platten wurden senkrecht in eine Halterung eingespannt.

Zu je 20 ml Gelansatz A bzw. B wurden zur Einleitung der Polymerisation 200 µl Ammoniumperoxydisulfat 1,5 % und 10 µl TEMED zugefügt. Die Gellösungen wurden sofort über eine permanent in einem Eisbad gekühlte Mischkammer und eine Pumpe zu einem Trenngel (Acrylamid-Gradient 5 bis ca. 25 %) gegossen (Abbildung 4). Vor den Gellösungen wurden 2 ml Wasser in die Gelkammer gepumpt. Durch Unterschichten wurde die Gellösung eingefüllt. Die Höhe des fertigen Trenngels betrug 110 mm. Die Gele polymerisierten mindestens 2 Stunden erschütterungsfrei.

β) Durchführung der Gradientengel-Elektrophorese

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das überschichtete Wasser abgekippt. Dem Sammelgelansatz wurden 100 µl Ammoniumperoxydisulfat 10 % und 10 µl TEMED zugesetzt. Das Sammelgelmateriel wurde sofort auf das Gradientengel gegossen, ohne zwischen Trenn- und Sammelgel Blasen entstehen zu lassen. Die anschließende Polymerisationszeit war 30 Minuten. Durch ein Model, das auf die Oberfläche des noch flüssigen Sammelgelmateriels ge-

steckt wurde, bildete sich an einem Rand des Sammelgels eine "Nische" aus. Nach Beendigung der Polymerisation wurde diese "Nische" mit 5  $\mu$ l des Molekulargewichtsmarkers gefüllt. Dann wurde mit durch Erwärmung verflüssigter Agarose 1 % das äquilibrierte Ampholingel an die Oberfläche des Sammelgels anpolymerisiert (Abbildung 6). Das vertikal orientierte Plattengel war also von oben nach unten folgendermaßen aufgebaut:

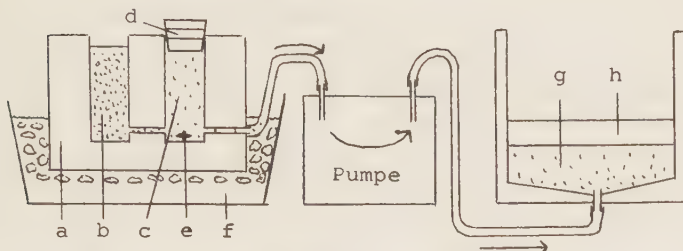
1. Ampholingel
2. Agarose 1 %
3. Sammelgel 3 % (Lämmlytyp, ca. 20 mm)
4. Gradientengel 5 - 20 % (Lämmlytyp, ca. 110 mm).

Die Gel-tragenden Glasscheiben wurden in einen Platten-gel-Elektrophorese-Apparat mit oberer und unterer Pufferkammer vertikal eingespannt (Abbildung 5). Die Pufferkammern wurden mit Laufpuffer gefüllt, eventuelle Luftblasen zwischen Gel und Puffer vorsichtig entfernt und die Platinelektroden der beiden Kammern an ein Spannungsgerät angeschlossen (Kathode oben). Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 250 V (entsprechend ca. 20 V/cm) für 4,5 Stunden bei 4°C. Anfangs floß ein Strom von ca. 40 mA, gegen Ende des Laufs von ca. 20 bis 25 mA.

#### g) Färben und Trocknen der Gele

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele entnommen, einige Stunden in Färbebad gelegt und anschließend wieder entfärbt, in der Regel in mehrmals gewechseltem "schwachen" Entfärbebad. Die Entfärbung konnte beschleunigt werden, wenn das Gel zunächst zwei Stunden in dem "starken" und erst danach in dem "schwachen" Bad entfärbt wurde. Der Entfärbevorgang war abgeschlossen, wenn nicht Protein-tragende Gelbereiche völlig farblos waren. Die Gele wurden über einem Leuchtkasten auf SW-Film photographiert und zur weiteren Aufbewahrung bei 70°C im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

Abbildung 4: Die Herstellung der Gradientengele;  
Schemazeichnung



Erklärung: a = Mischkammer; b = Gelansatz 25 %; c = Gelansatz 5 %; d = Stopfen; e = Magnetrührer; f = Eiswasserbad; g = Gradientengel; h = Wasser; = Fließrichtung; für jedes Volumen, das aus Kammer c fließt, kommt ein Volumen aus Kammer b.

Abbildung 5: Schnitt durch den Gelelektrophorese-  
Apparat; Schemazeichnung

a = Obere Pufferkammer  
b = Plattengel zwischen  
Glasplatten  
c = Untere Pufferkammer

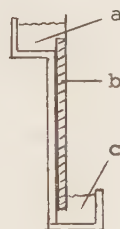
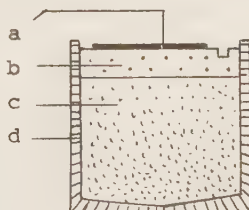


Abbildung 6: Trenngel und Sammelgel; Aufsicht

a = Ampholینگel  
b = Sammelgel mit  
"Nische"  
c = Trenngel  
d = Kunststoffleisten



## D. ERGEBNISSE

### 1. Die untersuchten Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen

Die B-CLL geht grundsätzlich zum Zeitpunkt der erstmaligen Diagnosestellung mit einer Ausschwemmung maligner Zellen in das Blut einher. Dagegen wird bei LPI nur in etwa zwei Drittel aller Erkrankungen anfangs eine absolute Vermehrung der zirkulierenden lymphatischen Zellen auf über 4000/ $\mu$ l festgestellt (29).

Die LPI-Fälle mit leukämischem Verlauf sind von der B-CLL besonders schwer abzugrenzen. Die Untersuchung der immunologischen Zellmarker der zirkulierenden malignen Zellen kann zu der richtigen Diagnose führen, wenn in diesen Zellen neben anderen Merkmalen der B-Reihe zytoplasmatisches Immunglobulin (CIg) nachgewiesen werden kann. Dadurch läßt sich eine B-CLL im Sinne der Kiel Klassifikation ausschließen. Gelingt der Nachweis von CIg trotz des Verdachts auf LPI nicht, ist man wie bei den nicht-leukämischen Immunozytomen auf die histologische Befundung des Knochenmarks, der Milz oder am besten eines befallenen Lymphknotens angewiesen. Die typische pleomorphe LPI-Histologie in Verbindung mit den in der Einleitung beschriebenen Befunden der Zytochemie, Immunologie und Elektronenmikroskopie führt dann zu der Diagnose Immunozytom.

Es ist allerdings auch nach der sehr ausführlichen Beschreibung der NHL im Sinne der Kieler Lymphomgruppe durch Lennert und Mitarbeiter (51,52,81) umstritten, ob die plasmazytoide Komponente in der Histologie eines Lymphknotens generell die Einordnung in die prognostisch gegenüber der B-CLL ungünstigere Lymphomgruppe LPI erlaubt. Es wird angeführt, daß die Entität LPI auch Fälle mit reaktiver, also nicht maligner Vermehrung plasmazytoider Zellen enthalten könnte (39,43). Auch Lennert schließt diese Möglichkeit nicht prinzipiell aus. Im Einzelfall kann dieser Einwand widerlegt

werden, falls mit immunologischen Methoden der Beweis für die Monoklonalität der lympho- und plasmazytoiden Zellen erbracht wird.

Während bei der Beurteilung histologischer Präparate also aufwendige Zusatzuntersuchungen erforderlich sind, um die Zugehörigkeit der plasmazytoiden Zellen zu dem proliferierenden Zellklon zweifelsfrei zu sichern, stellt eine stark und permanent erhöhte Zahl von mononukleären Zellen im peripheren Blut von LPI-Patienten eine Population dar, die von vornherein mit hoher Wahrscheinlichkeit als maligne bezeichnet werden darf. Deshalb wurden in dieser Arbeit die pathologisch vermehrten mononukleären Zellen aus heparinisiertem Venenblut von Patienten untersucht, die an B-CLL oder der leukämischen Form des LPI erkrankt waren. Ergänzend wurden auch die zellulären Proteine einiger anderer NHL-Zellen niedriger Malignität aufgetrennt. Diese Fälle sind in Abschnitt c. dieses Kapitels aufgelistet. Alle Diagnosen entsprechen der modifizierten Kiel Klassifikation (51; Tabelle I). Zu Vergleichszwecken wurden auch die Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen in die Studie einbezogen.

Die wichtigsten Befunde der untersuchten NHL-Fälle sollen im Folgenden wiedergegeben werden.

#### a) Die Fälle von B-CLL

Die mononukleären Zellen von zwölf Patienten mit B-CLL wurden isoliert. Das Geschlecht war jeweils sechsmal weiblich bzw. männlich. Das Lebensalter betrug im Mittel bei den Frauen rund 67 Jahre, bei den Männern rund 59 Jahre, insgesamt also etwa 63 Jahre. Die Stadieneinteilung nach Rai et al. (69) ergab bei zwei Patienten Stadium 0, bei jeweils drei Patienten die Stadien I oder III und in vier Fällen das Stadium II. Patienten mit Stadium IV sind in der untersuchten Gruppe nicht enthalten.

Die Diagnose B-CLL war in acht Fällen histologisch untermuert, viermal durch ein Knochenmarkspräparat, dreimal durch die Untersuchung eines exstirpierten Lymphknotens und einmal durch die Befundung beider Organe. Bei sieben Patienten waren die immunologischen Marker der zirkulierenden mononukleären Zellen untersucht worden. Dabei waren membrangebundene Immunglobuline (SIg) und Mäuse-Erythrozyten-Rezeptoren (Maus-ER) in allen Fällen, Komplement-Rezeptoren (C3R) und Fragment C-Rezeptoren (FcR) meist nachweisbar. Die Suche nach zytoplasmatischen Immunglobulinen (CIg) und T-Zell-Markern verlief jeweils negativ. Von fünf dieser sieben Patienten war ebenfalls ein histologischer Befund bekannt. In zwei Fällen war die Diagnose nur zytologisch und zytochemisch gestellt.

Die Leukozytenzahl der CLL-Patienten lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Studie zwischen  $12 \times 10^3/\mu\text{l}$  und  $110 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut, im Mittel bei  $69 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Der Anteil der mononukleären Zellen machte zwischen 51 % und 98 % aus. In allen Fällen war die absolute Zahl der Lymphozyten größer als  $4000/\mu\text{l}$  (Tabellen V, VI).

Die Dauer der Erkrankung betrug bei einigen Patienten mehr als 10 Jahre. In anderen Fällen war die Diagnose im Laufe des zurückliegenden Jahres gestellt worden. Einige Patienten waren in der Vorgeschichte zytostatisch behandelt worden und/oder standen gerade unter zytostatischer Therapie. In den anderen Fällen war das Lymphom nicht anbehandelt worden (Tabelle V).

In einem Fall verdient der klinische Verlauf besondere Erwähnung. Es handelt sich um den Patienten K.R. (Tabellen V und VI). Die B-CLL war bei ihm seit fünf Jahren bekannt und durch eine Lymphknotenhistologie belegt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Arbeit hatten sich große axilläre, inguinale und abdominale Lymphome entwickelt. Gleichzeitig waren seit wenigen Wochen im peripheren Blut "Paraimmunoblasten" aufgetreten. Als

Tabelle V: Angaben zu Diagnose, Klinik und Therapie  
der Fälle von B-CLL, Teil 1

| Patient | Alter | Leuko-<br>zyten-<br>zahl<br>in $10^3/\mu\text{l}$ | Mono-<br>nukleäre<br>Zellen<br>in % | Zytostatisches<br>Therapieschema<br>vor zur Zeit<br>der Blutentnahme |                   |
|---------|-------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------|
| H.K.♀   | 79    | 68.8                                              | 98                                  | Knospe                                                               | Knospe            |
| B.C.♀   | 68    | 90.0                                              | 90                                  | --                                                                   | --                |
| S.E.♀   | 60    | 38.7                                              | 88                                  | Knospe                                                               | Knospe            |
| B.H.♂   | 60    | 12.2                                              | 51                                  | DeVita                                                               | --                |
| R.A.♂   | 55    | 25.0                                              | 88                                  | --                                                                   | --                |
| T.G.♂   | 53    | 64.0                                              | 69                                  | --                                                                   | --                |
| P.M.♀   | 72    | 78.7                                              | 94                                  | --                                                                   | --                |
| M.A.♀   | 68    | 100.0                                             | 95                                  | Knospe                                                               | --                |
| R.H.♂   | 59    | 34.7                                              | 80                                  | --                                                                   | --                |
| R.A.♀   | 54    | 100.0                                             | 92                                  | --                                                                   | Chlor-<br>ambucil |
| H.G.♂   | 57    | 110.0                                             | 97                                  | Chlor-<br>ambucil                                                    | --                |
| K.R.♂   | 68    | 104.0                                             | 90                                  | Knospe                                                               | CHOP              |

Abkürzungen: ♀ = Geschlecht weiblich; ♂ = Geschlecht männlich.

Zytostatische Schemata: Knospe (40); DeVita (20);  
CHOP (30,57).

Tabelle VI: Angaben zu Diagnose, Klinik und Therapie  
der Fälle von B-CLL, Teil 2

| Patient | Immunologische<br>Zellmarker                                            | Typische<br>Histo-<br>logie<br>aus | Stadium<br>nach Rai (69),<br>klinische<br>Besonder-<br>heiten |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| H.K.♀   | n.u.                                                                    | n.u.                               | III, AM                                                       |
| B.C.♀   | n.u.                                                                    | n.u.                               | III, AM                                                       |
| S.E.♀   | n.u.                                                                    | LK                                 | II, AM                                                        |
| B.H.♂   | n.u.                                                                    | LK                                 | I, AM                                                         |
| R.A.♂   | n.u.                                                                    | KM                                 | I, AM                                                         |
| T.G.♂   | SIg M-λ +, FcR +,<br>C3bR +, C3dR ++,<br>Maus-ER ++.                    | KM                                 | II                                                            |
| P.M.♀   | SIg polyvalent (+),<br>C3bR +, C3dR ++,<br>Maus-ER ++.                  | n.u.                               | O                                                             |
| M.A.♀   | SIg M-κ ++,<br>FcR +, Maus-ER (+).                                      | KM                                 | I                                                             |
| R.H.♂   | SIg polyvalent (+),<br>FcR +,<br>Maus-ER in 90 % ++.                    | n.u.                               | O, AM                                                         |
| R.A.♀   | SIg Typ λ monoklonal +,<br>FcR (+), Maus-ER (+).                        | KM                                 | III                                                           |
| H.G.♂   | SIg Typ λ monoklonal +,<br>FcR -, C3R -,<br>Maus-ER + : Atypisch!       | LK+KM                              | II, AM                                                        |
| K.R.♂   | SIg polyvalent (+),<br>FcR +, Maus-ER ++,<br>hoher Lymphoblastenanteil! | LK                                 | II, AM                                                        |

Abkürzungen: LK = Lymphknoten; KM = Knochenmark;  
n.u. = nicht untersucht; AM = Antikörpermangel;  
SIg = Membrangebundenes Immunglobulin; FcR =  
Fragment C-Rezeptor; C3bR, C3dR = Subtypen des  
Komplement-Rezeptors; Maus-ER = Mäuse-Erythro-  
zyten-Rezeptor; - = negativ; (+) = schwach  
positiv; + = positiv; ++ stark positiv.

diese Untersuchung durchgeführt wurde, lag die Leukozytenzahl bei  $104.0 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut und der Anteil der mononukleären Zellen bei 90 % mit zahlreichen großen Blasten. Wir nehmen einen Übergang in ein hoch-malignes Lymphom an, wie er bei der CLL gelegentlich beobachtet wird (52).

b) Die Fälle von LPI

Sechs Patienten mit der klinischen Diagnose LPI konnten untersucht werden, fünf Männer und eine Frau. Das Alter der Männer lag im Mittel bei knapp 63 Jahren, die Frau war 62 Jahre alt. Insgesamt war das Durchschnittsalter aller Fälle 62,5 Jahre. Sämtliche Erkrankungen befanden sich zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen im Stadium IV nach der Ann-Arbor-Klassifikation (19). In vier Fällen lag eine Splenomegalie vor, in einem Fall hatte die Vergrößerung der Milz bereits die Splenektomie erforderlich gemacht. Zwei Patienten wiesen ein monoklonales IgM-Paraprotein im Serum im Sinne eines Morbus Waldenström auf (Tabelle VII).

Die Diagnose LPI war in fünf Fällen mit einem histologischen Befund belegt, durch die Untersuchung eines Lymphknotens in zwei Fällen, des Knochenmarks in zwei weiteren Fällen und einmal durch die Beurteilung beider Organe. Bei fünf Patienten waren die immunologischen Marker der zirkulierenden malignen Zellen ermittelt worden. In vier Fällen konnte zytoplasmatisches Immunglobulin (CIg) nachgewiesen werden, im fünften Fall legte sich der Untersucher nur auf ein B-Zell-Lymphom fest (Tabelle VII).

Die Werte für Leukozytenzahl und für den Anteil der mononukleären Zellen im peripheren Blut der LPI-Patienten sind in Tabelle VII aufgeführt. Bei allen Patienten lag die leukämische Verlaufsform des Immunozytoms vor, mit Leukozytenzahlen zwischen  $22.5 \times 10^3/\mu\text{l}$  und  $108 \times 10^3/\mu\text{l}$

Blut und prozentualen Anteilen der mononukleären Zellen im Differentialblutbild zwischen 50 % und 99 %.

Die Diagnosestellung lag bei den Patienten zum Untersuchungszeitpunkt zwischen wenigen Monaten und sechs Jahren zurück. Bezüglich der Frage, ob die Patienten vor oder im Zeitraum der Blutentnahme unter zytostatischer Therapie standen, sei auf die Tabelle VII verwiesen.

Auch bei einem LPI-Fall (Patient T.F., Tabelle VII) ist die außergewöhnliche Klinik erwähnenswert. Nach jahrelangem nicht therapiebedürftigen Verlauf ging diese Erkrankung etwa drei Jahre vor dieser Studie in ein hochmalignes Stadium über. Es entwickelten sich in allen Regionen zum Teil massive Lymphknotentumore, die erhebliche Beschwerden verursachten. Eine Splenomegalie kam hinzu, die nach etwa zwei Jahren die Splenektomie erforderlich machte. Zunächst wurde nach dem Schema von Knospe et al. (40) behandelt. Es schlossen sich Therapieversuche mit den Zytostatika-Kombinationen COP (2), COPP (25,59) und CHOP (30,57) an. Es konnte jedoch weder eine Voll- noch eine Teilremission erzielt werden. Zuletzt trat eine ausgeprägte Ausschwemmung neoplastischer Zellen in das Blut auf. Am Entnahmetag für diese Studie war die Leukozytenzahl etwa  $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Es kam zur Entwicklung lymphozytenreicher Pleuraergüsse. Der Patient verstarb nach dreijährigem hochmalignen Verlauf, vier Wochen nach der Entnahme der hier untersuchten Zellen. Die Aufarbeitung eines wenige Monate vor dem Exitus exstirpierten Lymphknotens hatte eine unreife Form des LPI mit der typischen pleomorphen Histologie und einer Prolymphozytenvermehrung ergeben.

Zusätzlich zu den beschriebenen Immunozytomen, bei denen die Proteine der mononukleären Zellen des Blutes aufgetrennt wurden, ist auch ein Fall in die Studie einbezogen, bei dem gewebegebundene mononukleäre Zellen untersucht werden konnten. Es handelte sich um eine etwa

Tabelle VII: Angaben zu Diagnose, Klinik und Therapie der Fälle von LPI

| Patient | Alter | Leuko-<br>zyten-<br>zahl<br>in $10^3/\mu\text{l}$ | Mono-<br>nukleäre<br>Zellen<br>in % | Immuno-<br>logische<br>Zellmarker                 | Typische<br>Histo-<br>logie<br>aus | Stadium,<br>klinische<br>Besonder-<br>heiten | Mono-<br>klonale<br>Gammopa-<br>thie | Zytostatisches<br>Therapieschema<br>vor der Blutentnahme |
|---------|-------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Z.P.♂   | 49    | 54.8                                              | 98                                  | CIg +, SIg Typ $\kappa$ +<br>(monoklonal), FcR +. | LK+KM                              | IV<br>Splenomegalie                          | ∅                                    | Knospe Chlor-<br>ambucil                                 |
| H.J.♀   | 62    | 108.0                                             | 99                                  | CIg +, keine CLL-<br>Marker nachweisbar.          | KM                                 | IV<br>Splenomegalie                          | ∅                                    | --                                                       |
| C.G.♂   | 73    | 23.1                                              | 92                                  | CIgM +, FcR ++,<br>SIg + (IgM, IgD, $\kappa$ ).   | LK                                 | IV                                           | ∅                                    | Knospe --                                                |
| K.M.♂   | 70    | 30.0                                              | 50                                  | CIgM +, FcR +,<br>SIg + (IgM, $\kappa$ ).         | n.u.                               | IV<br>Splenomegalie                          | IgM                                  | --                                                       |
| N.W.♂   | 73    | 22.5                                              | 95                                  | n.u.                                              | KM                                 | IV; AM<br>Splenomegalie                      | IgM (Prednison)                      | --                                                       |
| T.F.♂   | 48    | 100.0                                             | 95                                  | B-Zell-Marker +<br>(SIg Typ $\kappa$ +, FcR +).   | LK                                 | IV<br>Z.n. Splenektomie                      | ∅                                    | Knospe,<br>COP, COPP                                     |

Abkürzungen siehe Tabellen V und VI. #: In allen Fällen Stadienangabe nach Ann-Arbor (19).

Zytostatische Schemata: Knospe (40); COP (2); COPP (25,59); CHOP (30,57).

60-jährige Patientin mit einer massiven Splenomegalie. Die klinische Arbeitsdiagnose lautete Immunozytom. Die Milz wurde exstirpiert. Sie hatte ein Gewicht von 2500 g. Die Histologie bestätigte die Diagnose, ebenso die Untersuchung der immunologischen Zellmarker. 90 % der mononukleären Zellen, die aus dem Organ isoliert werden konnten, besaßen membrangebundenes und zytoplasmatisches Immunglobulin der Klasse IgM- $\lambda$ . Außerdem war als weiterer B-Marker auf 45 % der Zellen der Fc-Rezeptor exprimiert. Etwa 10 % der Zellen waren kontaminierende T-Lymphozyten. Von diesem Organ konnten 50 g Gewebe für diese Studie verarbeitet werden.

c) Die Fälle mit anderen niedrig-malignen NHL

Das Kernstück dieser Arbeit bildet der Vergleich der Proteine von B-CLL- und LPI-Zellen in der 2-dimensionalen Gradientengel-Elektrophorese. Um die Frage beantworten zu können, ob eventuelle Auffälligkeiten der Proteinmuster dieser Zellen für das betreffende Lymphom spezifisch oder auch bei anderen NHL-Entitäten nachweisbar wären, wurden auch die Proteine niedrig-maligner NHL außer B-CLL und LPI aufgetrennt. Es handelte sich dabei im einzelnen um Fälle aus folgenden Obergruppen der Kiel Klassifikation:

M.L. lymphocytic

Chronische lymphatische Leukämie

vom T-Typ (T-CLL) 1 Fall

Prolymphozytäre Leukämie (PLL) 1 Fall

Haarzellenleukämie (HZL) 1 Fall

M.L. centrocytic 2 Fälle

M.L. centroblastic/centrocytic 2 Fälle

Im Folgenden sollen einige Angaben, insbesondere zur Diagnose dieser Fälle, ausgeführt werden. Alle Daten, einschließlich Klinik und Therapie, sind in den Tabellen VIII und IX zusammengefaßt.

α) Lymphozytische NHL außer B-CLL und LPI

Die B-CLL ist das bei weitem häufigste lymphozytische NHL. Daneben gibt es jedoch eine Reihe weiterer, gut definierter Lymphome sowohl der B- als auch der T-Zell-Reihe, die ebenfalls als lymphozytische NHL klassifiziert sind. Aus dieser Gruppe wurden je ein Fall mit T-CLL, PLL und mit HZL untersucht.

Die CLL vom T-Typ stellt nur etwa 3 % aller CLL-Fälle. Die Histologie befallener Lymphknoten ähnelt dabei sehr derjenigen der B-CLL. Allerdings fehlen hier Pseudofollikel mit Lymphoblasten und Prolymphozyten, die für die B-CLL ausgesprochen charakteristisch sind. Die T-CLL-Lymphozyten tragen stark Saure-Phosphatase-positive und Saure-Esterase-positive Granula im Zytoplasma und Rezeptoren für Schafsserythrozyten auf der Zellmembran, während typische Rezeptoren der B-Reihe wie Komplement-Rezeptoren und Fragment C-Rezeptoren fehlen (35,82).

Bei dem Patienten H.R. (Tabellen VIII und IX) stützte sich die Diagnose auf die Morphologie der leukämischen Zellen und auf die Testung der immunologischen Zellmarker, die für T-CLL typisch waren. Für die Diagnose sprach als weiteres Kriterium ein ausgeprägter Milztumor bei gleichzeitig nur diskreter Vergrößerung zervikaler und axillärer Lymphknoten. Die Kombination Splenomegalie und Fehlen großer Lymphome bei CLL ist charakteristisch für den T-Typ dieser Leukämie (52).

Eine Patientin der studierten Gruppe litt an einer prolymphozytären Leukämie (PLL). Diese Krankheit ist eine selten zu beobachtende Sonderform der CLL. Die Histologie eines exstirpierten Lymphknotens entsprach einem lymphozytischen NHL; der Pathologe nannte als mögliche Diagnosen die PLL und die HZL. Die zytochemische Untersuchung zeigte eine positive, aber Tartrat-hemmbar Saure-Phosphatase-Reaktivität der leukämischen Zellen.

Entscheidend waren die immunologischen Zellmarker. Die zirkulierenden mononukleären Zellen trugen monoklonales SIg der Klasse IgG- $\kappa$  und exprimierten beide Subtypen des Komplement-Rezeptors, während Fc-Rezeptoren und Mäuse-Erythrozyten-Rezeptoren nicht nachweisbar waren. Diese Konstellation ist kennzeichnend für die chronische Form der PLL (82). Wir konnten der Patientin H.K. im Zeitraum eines halben Jahres zweimal Blut entnehmen und so nach eventuellen Veränderungen des Proteinmusters der lymphatischen Zellen suchen.

Bei dem dritten lymphozytischen NHL (Patientin M.A.) handelte es sich um eine Haarzellen-Leukämie (hairy cell leukemia, HZL). Über diese Lymphom-Entität liegen zwar viele Befunde vor, sie widersprechen sich jedoch teilweise von Fall zu Fall, so daß ein unübersichtliches Bild besteht. Immerhin ist die Diagnose mit Sicherheit erlaubt, wenn die leukämischen Zellen eines Patienten die typischen haarigen, pseudopodienartigen Fortsätze aufweisen und eine saure Phosphatase enthalten, die im Gegensatz zu derjenigen fast aller anderen Zellformen Tartrat-resistent ist (82). Diese beiden Kriterien waren in dem untersuchten Fall gegeben. In der Vorgeschichte dieser Patientin hatte ein massiver Milztumor zur Splenektomie geführt. Die Histologie der Milz sowie einer Beckenkammstanze sprachen ebenfalls für eine HZL. Im Widerspruch zu der Diagnose stand nur die Verteilung der immunologischen Zellmarker der Haarzellen. Die pathologischen Zellen prägten neben anderen B-Markern beide Subtypen des Komplement-Rezeptors in hoher Dichte aus, was nicht für die HZL, sondern eher für die PLL typisch ist (82).

Tabelle VIII: Angaben zu Diagnose, Klinik und Therapie der Fälle von niedrig-malignen NHL  
außer B-CLL und LPL, Teil 1

| Patient | Alter | Diagnose,<br>ggf. DD | Leuko-<br>zyten-<br>zahl<br>in 10 <sup>3</sup> /µl | Mono-<br>nukleäre<br>Zellen<br>in % | Stadium,<br>klinische<br>Besonder-<br>heiten    | Zytostatisches<br>Therapieschema<br>vor zur Zeit<br>der Blutentnahme |
|---------|-------|----------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| H.R.♂   | 69    | T-CLL                | 218.0                                              | 98                                  | IV<br>Splenomegalie, AM,<br>Stadium IV nach Rai | Knospe Chlor-<br>ambucil                                             |
| H.K.♀   | 72    | PLL                  | 17.1<br>15.1                                       | 90<br>88                            | IV<br>Splenomegalie                             | Knospe<br>--                                                         |
| M.A.♀   | 43    | HZL<br>(DD:PLL)      | 15.4                                               | 72                                  | IV<br>Z.n.Splen-<br>ektomie                     | --<br>--                                                             |
| B.K.♀   | 78    | M.L.cb               | 30.2                                               | 81                                  | IV<br>Splenomegalie                             | Knospe<br>Knospe                                                     |
| F.U.♂   | 41    | M.L.cb               | 23.6                                               | 88                                  | IV                                              | COPP<br>--                                                           |
| K.F.♀   | 71    | M.L.cb/cc            | 38.0                                               | 90                                  | IV<br>Splenomegalie                             | --<br>Vinblastin                                                     |
| V.J.♀   | 60    | M.L.cb/cc            | 17.5                                               | 62                                  | IV<br>AM                                        | Knospe<br>--                                                         |

※: Stadienangabe nach der Ann-Arbor-Klassifikation, falls nicht anders angegeben;  
Abkürzungen siehe Tabellen V und VI; Zytostatische Schemata: Knospe (40), COPP (25,59).

Tabelle IX: Angaben zu Diagnose, Klinik und Therapie der Fälle von niedrig-malignen NHL  
außer B-CLL und LPI, Teil 2

| Patient | Diagnose,<br>ggf. DD | Immunologische<br>Zellmarker                                                       | Typische<br>Histologie<br>aus | Befunde<br>der Zytologie<br>und Zytochemie                                                |
|---------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| H.R.♂   | T-CLL                | T-Zell-Marker<br>überwiegend                                                       | n.u.                          | --                                                                                        |
| H.K.♀   | PLL                  | Sig G-K +, FcR -,<br>C3bR +, C3dR +, Maus-<br>ER -: Passend zu PLL                 | LK                            | Saure Phosphatase tartrat-<br>hemmbar +, Saure Esterase +,<br>PAS-Reaktion --             |
| M.A.♀   | HZL<br>(DD:PLL)      | Sig M-λ +, FcR ++,<br>C3R ++: Zusammen mit<br>der Morphologie PLL?                 | KM+Milz:<br>HZL!              | Saure Phosphatase tartrat-<br>resistent ++; Haarzellen<br>im Blut zahlreich.              |
| B.K.♀   | M.L.cc               | Sig (M,G,K) +, FcR +,<br>C3dR +: B-Zell-<br>Lymphom                                | LK+KM                         | Reichlich cleaved cells<br>im Blut                                                        |
| F.U.♂   | M.L.cc               | 1-3 % T-Marker, auf ca.<br>15 % B-Marker (FcR,Maus-ER)<br>cleaved cells +: wohl CC | n.u.                          | Reichlich cleaved cells<br>im Blut                                                        |
| K.F.♀   | M.L.cb/cc            | Sig Typλ +, FcR +,<br>Maus-ER +:<br>B-Zell-Lymphom                                 | LK                            | Zirkulierende Zellen über-<br>wiegend: Blasten (Saure<br>Phosphatase +, PAS-Reaktion --). |
| V.J.♀   | M.L.cb/cc            | Sig Typλ ++, Ia-like<br>Antigen +: Phänotypisch<br>Keimzentrumlymphom              | LK+KM                         | --                                                                                        |

Abkürzungen siehe Tabellen V und VI.

### B) Zentrozytische NHL

Das zentrozytische NHL (M.L. centrocytic, M.L.cc) wird aus der Morphologie der proliferierenden Zellen diagnostiziert. Diese haben auffallend unregelmäßig gekantete und gekerbte Kerne. Sie sind nach dieser Besonderheit als "cleaved cells" benannt. In der Lymphknotenhistologie fällt die diffuse, reinrassige Proliferation dieser Zellen auf, wodurch die Abgrenzung von den anderen niedrig-malignen NHL möglich ist, die immer gemischtzellige Wachstumsbilder entwickeln. Wichtig zur Sicherung der Diagnose ist der immunologische Nachweis der B-Zell-Natur der Zentrozyten, da eine Reihe von T-Zell-Lymphomen morphologisch schwer oder überhaupt nicht von zentrozytischen Lymphomen zu unterscheiden sind (52).

Zwei Fälle mit M.L.cc und leukämischer Verlaufsform wurden hier untersucht. Beidemal fielen in Blutaussstrichen zahlreiche "cleaved cells" auf. Im Fall B.K.♀ bestätigten Knochenmarks- und Lymphknotenhistologie die Diagnose. Bei beiden Patienten lagen die immunologischen Zellmarker vor. Im Fall B.K.♀ entsprach die Kombination von monoklonalen, membrangebundenen Immunglobulinen, Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren bei Fehlen von Mäuse-Erythrozyten-Rezeptoren der typischen Konstellation des M.L.cc (82). Im Fall F.U.♂ wurden nur auf einem kleinen Teil der zirkulierenden Zellen B-Marker einschließlich Mäuse-Erythrozyten-Rezeptoren oder T-Marker nachgewiesen. Der Untersucher sprach sich dennoch unter Berücksichtigung der Morphologie für ein zentrozytisches Lymphom aus (Tabellen VIII und IX).

### γ) Zentroblastisch/zentrozytische NHL

Das zentroblastisch/zentrozytische Lymphom der Kiel Klassifikation (M.L.cb/cc; früher Morbus Brill-Symmers) ist wie das zentrozytische Lymphom eine Neoplasie der Keimzentrumszellen des lymphatischen Gewebes (36,49).

Es ist durch die gemischte Proliferation von Zentrozyten und Zentroblasten sowie durch follikuläres oder gleichzeitiges follikuläres und diffuses Wachstum gekennzeichnet. Nur in sehr seltenen Ausnahmen ist der Wachstumstyp ausschließlich diffus. Das cb/cc Lymphom entspricht in dieser Definition weitgehend der Gesamtheit der "nodulär" wachsenden Lymphome, die Rappaport et al. in ihrer Klassifikation als Entität auflösten und als architektonische Variante jeglicher Lymphomtypen ansahen (70,71). In der Kiel Klassifikation ist es eines der häufigsten Lymphome, mit etwa gleicher Inzidenz wie die CLL (16,41,51). Abzutrennen ist das cb/cc Lymphom von den anderen niedrig-malignen NHL mit gemischtzelliger Proliferation (B-CLL,LPI). Dabei macht besonders die Unterscheidung zwischen LPI und cb/cc Lymphom Schwierigkeiten. Zwischen dem polymorphen Typ des Immunozytoms und dem M.L.cb/cc scheinen unter funktionellen und pathologisch-anatomischen Gesichtspunkten fließende Übergänge zu bestehen (52).

Zwei leukämisch verlaufende zentroblastisch/zentrozytische Lymphome wurden für diese Arbeit erfaßt. In beiden Fällen basierte die Diagnose auf der Histologie exstirpierter Lymphknoten. Die immunologischen Zellmarker paßten jeweils zu der gestellten Diagnose. Vor allem konnten keine zytoplasmatischen Immunglobuline nachgewiesen werden, die für die Diagnose LPI zu fordern wären.

## 2. Die Eigenschaften der angewendeten 2-dimensionalen Gelelektrophorese

Die Einführung einer 2-dimensionalen Acrylamidgel-Elektrophorese-Technik, die zwei verschiedene Auftrennungsprinzipien kombiniert, hat einen neuen Weg eröffnet, komplexe Proteingemische zu untersuchen (64). Diese Technik verbindet eine isoelektrische Fokussierung

mit Ampholinen in der ersten Dimension und eine SDS-Gradientengel-Elektrophorese nach Lämmli (45) in der zweiten Dimension. Die Kombination zweier schon an sich hoch auflösender Methoden erbringt eine sehr hohe Auflösungskraft. An mit Coomassieblau gefärbten Gelen lassen sich bis zu 400 Proteine unterscheiden. Gleichzeitig kann jedes identifizierte Protein durch zwei biochemische Eigenschaften näher charakterisiert werden: Den isoelektrischen Punkt (pI) und das Molekulargewicht (MG).

#### a) Probenaufbereitung

Die Auftrennung von Gesamtzellhomogenaten hat gezeigt, daß die Anwesenheit von Nukleinsäuren die optimale Auflösung von Proteingemischen in der 2-dimensionalen (2-D-) Gelelektrophorese behindert. Nukleinsäuren (DNS und RNS) binden ionisch an Proteine, besonders an basische Ampholine, und stören dadurch die Bildung des pH-Gradienten und die Fokussierung von Proteinen im Ampholinel (64). Es konnte demonstriert werden, daß der Verdau mit Nuklease S1 aus *Aspergillus oryzae* in Anwesenheit von Harnstoff 9 M und SDS 2,4 % zu einem weitgehenden Abbau der Nukleinsäuren führt (91).

Weiter ist eine Beeinträchtigung der 2-D Technik durch nicht ausreichend denaturierte und desaggregierte Proteinkomplexe in den Zellysaten möglich, die nur unvollständig in das Ampholinel übergehen und suboptimal fokussieren. Um diesen Störfaktor zu umgehen, enthielt der Aufbereitungspuffer geringe Mengen SDS. Außerdem wurden die Zellysate nach Abschluß der Probenaufbereitung noch für eine Stunde bei 100000 x g zentrifugiert, um verbliebene Proteinaggregate sicher zu beseitigen.

Bei Vorversuchen stellte sich heraus, daß die Vergleichbarkeit der verschiedenen 2-D Gele ungenügend ist, wenn

gleiche Zellzahlen für die Probenaufbereitung und gleiche Lysatvolumina in die 1. Dimension eingesetzt werden. Deshalb wurde der Proteingehalt der Zellysate mit der Methode von Lowry et al. (54) bestimmt und, mit im allgemeinen guter Übereinstimmung, festgesetzte Proteinmengen aufgetrennt, in der Regel zwischen etwa 100 und 150 µg. Gelegentlich ergaben sich aber auch bei diesem Vorgehen deutliche Ungleichmäßigkeiten in der Proteinbeladung der 2-D Gele. Dieses Verhalten ist nicht Überraschend, wenn man bedenkt, daß mit der verwendeten 2-D Technik nur ein Teil der zellulären Proteine erfaßt wird, jedoch nicht die basischen Proteine, besonders nicht die chromosomalen Histone des Zellkerns. Für maligne Zellen, wie sie hier untersucht wurden, ist aber gerade die mehr oder weniger ausgeprägte Verschiebung der Kern-Plasma-Relation und damit ein wechselnder Anteil basischer Proteine an den gesamten Eiweißmolekülen der Zellen typisch. In solchen Fällen wurde die Proteinmenge vor einer erneuten Auftrennung anhand der Größe eines starken Doppelflecks korrigiert, der in allen 2-D Gelen hervortrat. Es handelt sich dabei um die gamma- und beta-Form des Aktin mit einem Molekulargewicht von 42000 d und einem isoelektrischen Punkt von ca. 5.8. Dieser Eiweißkörper ist als Bestandteil des Zytoskeletts das am stärksten repräsentierte zelluläre Protein (siehe Abbildung 10, Protein Nr. A).

#### b) Auftrennung

In der 1. Dimension wurden die Proteine in 4 %igen Acrylamidgelen, die 9,2 M Harnstoff, 2 % NP-40 und ein Ampholingemisch der pH-Bereiche 5 - 7 (4 %) und 3.5 - 10 (1 %) enthielten, mit einem Spannungs-Zeit-Produkt von 7800 V x h fokussiert. Die pH-Messung normal mit Proben beladener Gele in entgastem Wasser ergab einen annähernd linearen pH-Gradienten von pH 4.5 bis 6.8

(Abbildung 7). Die relative Standardabweichung der nach mehreren verschiedenen Fokussierungen gemessenen Werte lag bei 1,0 bis 1,5 Prozent, lediglich an dem sauren Ende der Gele ist die Streuung der pH-Werte größer. Die Gellänge war nach Beendigung der Elektrophorese 105 mm.

Die fokussierten Ampholingele wurden 30 Minuten in SDS-haltigem Probenpuffer äquilibriert. In dieser Zeit übernahmen die Gele die Bedingungen des Probenpuffers und die SDS-Moleküle banden an die Proteine. Die resultierende negative Nettoladung der Proteine ermöglicht ihnen in einem elektrischen Feld die Wanderung zur Anode.

In dieser Untersuchung wurden in der 2. Dimension SDS-Gradientengele mit einem Anstieg der Polyacrylamid-Konzentration von 5 auf ca. 20 % verwendet. Die zurückgelegte Wegstrecke der Proteine in einer SDS-Gel-Elektrophorese läßt sich mit ihrem Molekulargewicht in Beziehung setzen (77,89). In unseren Gradientengelen lieferte die Auftrennung von Markierungsproteinen mit Molekulargewichten zwischen 25000 d und 220000 d eine lineare Beziehung zwischen der Strecke, welche die Proteine in einem Gel in Richtung zu der Anode zurücklegten, und dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Abbildung 8). Mißt man die Wanderungsstrecke eines unbekannten, interessierenden Proteins und überträgt sie in die Abbildung 8, so kann auf der Ordinate der Logarithmus des MG dieses Proteins abgelesen werden.

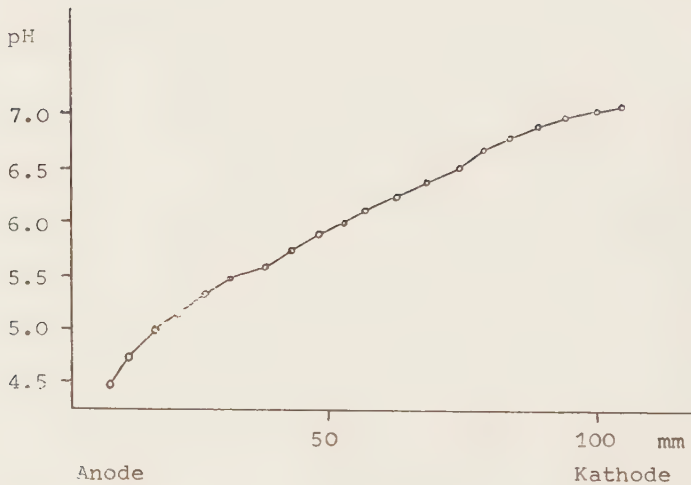


Abbildung 7: Der pH-Gradient im Ampholigel

Dargestellt sind die Durchschnittswerte des pH nach Fofussierung mit 7800 V x h, bei einem Ampholingenisch mit 4 % Ampholinen pH 5 - 7 und 1 % Ampholinen pH 3,5 - 10 je Gel.

Tabelle X: Die Molekulargewichte der  
aufgetrennten Eichproteine

| Nummer | Protein                | MG       |
|--------|------------------------|----------|
| 1      | Myosin                 | 220000 d |
| 2      | $\beta$ -Galaktosidase | 116500 d |
| 3      | Phosphorylase B        | 94000 d  |
| 4      | Rinderserumalbumin     | 68000 d  |
| 5      | Katalase-Untereinheit  | 60000 d  |
| 6      | Ovalbumin              | 45000 d  |
| 7      | Aldolase-Untereinheit  | 40000 d  |
| 8      | Chymotrypsinogen       | 25000 d  |
| 9      | Myoglobin              | 17800 d  |
| 10     | Cytochrom C            | 12400 d  |

Dargestellt sind die verwendeten Eichproteine mit ihrem Molekulargewicht (MG) und ihrer Nummer in der Abbildung 8.

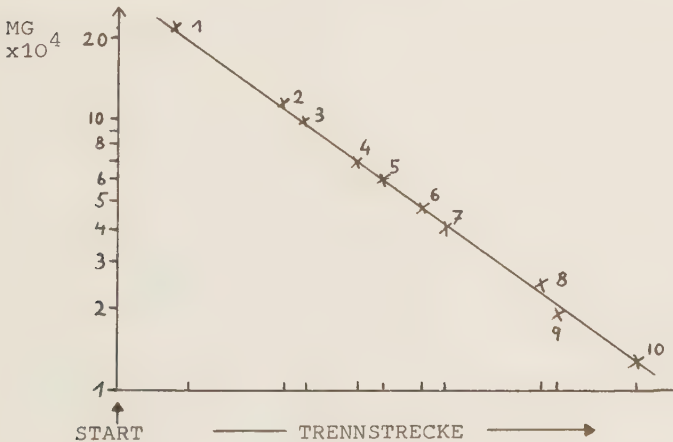


Abbildung 8: Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen  
in SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen

Dargestellt ist die halb-logarithmische Auftragung der Molekulargewichte von Eichproteinen gegen ihre zurückgelegte Wegstrecke. Die Nummern der Proteine entsprechen der Tabelle X.

### 3. Die Ergebnisse der 2-D Auftrennung der Proteine von NHL-Zellen

Mit der 2-dimensionalen Gradientengel-Elektrophorese, deren technische Durchführung und grundlegende Eigenschaften oben ausführlich geschildert sind, wurden die Proteine verschiedener NHL-Zellen aufgetrennt. Die Abstammung dieser Zellen ist in Teil D.1 erläutert worden.

Der Vergleich der Proteinmuster in den erhaltenen 2-D Gelen zeigte nach der Anfärbung der Proteine mit Coomassieblau eine außerordentliche Homologie, sowohl bei der Untersuchung von Fällen der gleichen Lymphomentität, als auch bei der Gegenüberstellung von Fällen verschiedener NHL-Klassen. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß alle NHL-Zellen nach heutigem Verständnis von eng verwandten Entwicklungsstufen der lymphatischen Zellreihe abstammen. Die Mehrzahl der identifizierbaren Proteinflecken war auf allen 2-D Gelen zu finden, wenn auch in unterschiedlicher Intensität und Relation zueinander. Als Beispiel sei hingewiesen auf die gamma- und beta-Form des Aktin, eines Proteins mit dem ungefähren MG 42000 d, welches in allen Gelen als der am stärksten angefärbte Fleck imponierte. Das Aktin ist ein ubiquitärer Bestandteil des Zytoskeletts, der zwischen 10 und 16 Prozent der gesamten zellulären Proteine ausmacht (11,46). Sein ungefähre isoelektrischer Punkt wird in der Literatur mit Werten zwischen 5.3 und 5.9 angegeben (46,56). Wir bestimmten den pI mit ca. 5.8. Das Aktin ist als endogener MG-Marker zu verwenden. Daneben wird in 2-D Proteinanalysen der pI eines interessierenden Polypeptides gelegentlich nicht als pH-Wert, sondern als relative Mobilität im Vergleich zu Aktin angegeben (z.B.10,11).

a) Der Vergleich der 2-D Proteinmuster von B-CLL- und LPI-Zellen

Auch bei B-CLL- und LPI-Zellen war eine weitgehende Übereinstimmung der 2-D Proteinmuster zu beobachten. Daneben traten jedoch einige signifikante Unterschiede auf. Die B-CLL-Zellen zeigen ausnahmslos einen Proteinfleck mit dem ungefähren MG 77000 d und pI von ca. 5.5 (Fleck Nr.1; Abbildungen 9 und 11). Dieser Fleck gehört zu einer Dreiergruppe von Proteinen mit dem gemeinsamen MG 77000 d, aber differierenden isoelektrischen Punkten von etwa 5.50, 5.55 und 5.60. Während die beiden Proteine mit den pI-Werten 5.60 und 5.55 in fast allen 2-D Gelen von LPI-Zellen ebenfalls auftreten, fehlt diesen regelmäßig das Protein mit dem pI 5.50. In einem Fall ist es als schwache Ausziehung der beschriebenen Dreiergruppe in den Bereich pI 5.5 fraglich angedeutet, jedoch nicht als klar abgrenzbarer Fleck ausgebildet.

Die B-CLL-Fälle zeigen sechs weitere zusätzliche Proteinflecken, die bei LPI nicht oder nur ausnahmsweise auftreten. Dagegen ist in allen LPI-Zellen (7/7) ein Proteinfleck mit dem ungefähren MG 27000 d und pI 5.9 zu identifizieren, welcher nur bei der Hälfte der B-CLL-Zellen (6/12) auftrat (Fleck Nr.8; Abbildungen 9, 11).

Die Ergebnisse sind ausführlich in den Tabellen XI, XII und XIII aufgelistet. In den Abbildungen 10 und 11 sind die 2-D Gele je eines typischen Falles von B-CLL bzw. LPI im Übersichtsbild und in Ausschnittvergrößerungen gegenübergestellt. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die 2-D Proteinmuster weiterer B-CLL-Fälle, die Abbildungen 14 und 15 die entsprechenden Muster einiger LPI-Fälle.

Bemerkenswert ist, daß die geschilderten Befunde auch bei den Patienten K.R.♂ (Diagnose B-CLL; siehe Tabellen V, VI) und T.F.♂ (Diagnose LPI; siehe Tabelle VII) zu erheben waren. In beiden Fällen war nach Verschlechte-

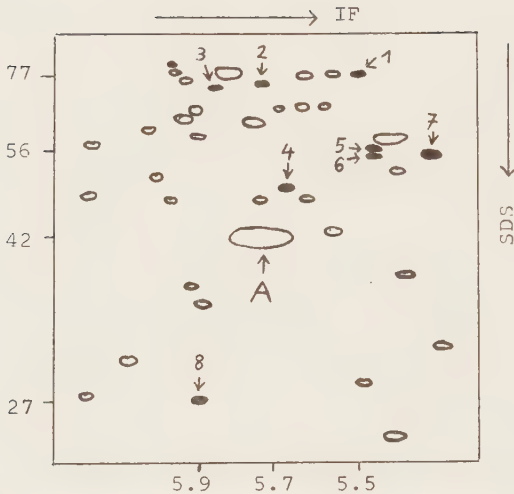


Abbildung 9: Schemazeichnung des relevanten Gelbereichs

Die ausgefüllten und nummerierten Flecken bezeichnen die relevanten Proteine Nr. 1 bis 8. Angegeben sind: links MG in  $10^3$  d; unten pI-Werte. A = Aktin.

Tabelle XI: Die relevanten Proteinflecken in den 2-D Gelen bei B-CLL und LPI

| Fleck Nr. | pI  | MG    | Identifizierbar<br>in x von n Fällen |         |
|-----------|-----|-------|--------------------------------------|---------|
|           |     |       | bei B-CLL                            | bei LPI |
| 1         | 5.5 | 77000 | 12/12                                | 0/7     |
| 2         | 5.7 | 75000 | 11/12                                | 2/7     |
| 3         | 5.8 | 74000 | 12/12                                | 1/7     |
| 4         | 5.7 | 51000 | 12/12                                | 0/7     |
| 5         | 5.4 | 59000 | 8/12                                 | 0/7     |
| 6         | 5.4 | 57000 | 6/12                                 | 0/7     |
| 7         | 5.3 | 56000 | 11/12                                | 0/7     |
| 8         | 5.9 | 27000 | 6/12                                 | 7/7     |

Tabelle XII: Die Verteilung der relevanten Protein-  
flecken im 2-D Gel bei den Fällen von B-CLL

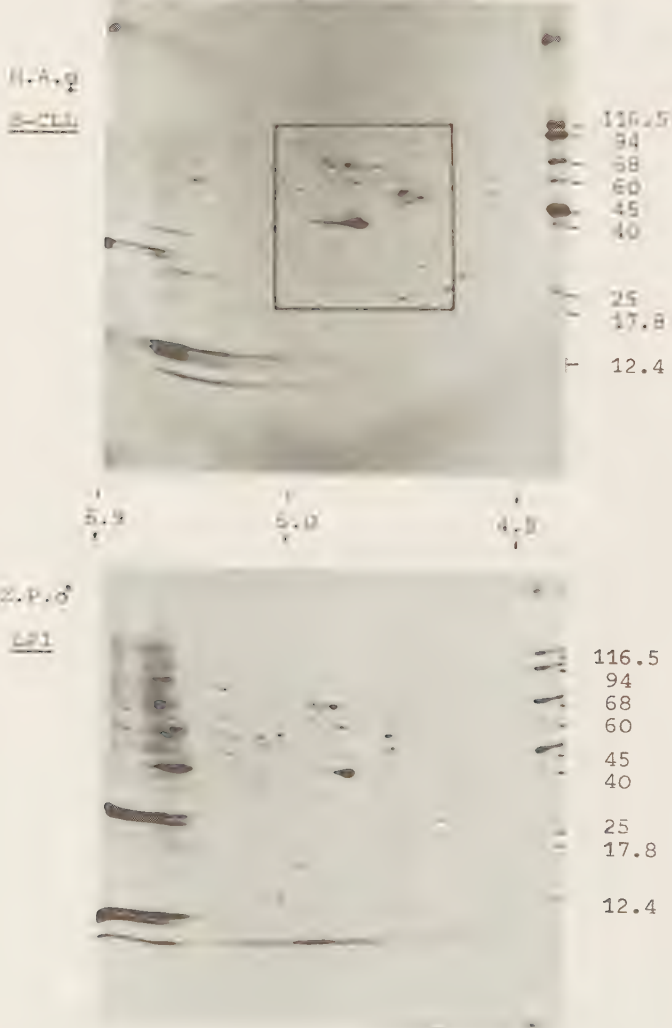
| Protein Nr.<br>Patient | 1 | 2 | 3 | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   |
|------------------------|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| H.K.♀                  | + | + | + | (+) | -   | -   | +   | +   |
| B.C.♀                  | + | + | + | +   | +   | +   | +   | -   |
| S.E.♀                  | + | - | + | +   | -   | -   | -   | -   |
| B.H.♂                  | + | + | + | +   | +   | +   | +   | -   |
| R.A.♂                  | + | + | + | (+) | +   | +   | +   | (+) |
| T.G.♂                  | + | + | + | +   | +   | (+) | +   | +   |
| P.M.♀                  | + | + | + | +   | (+) | -   | +   | +   |
| M.A.♀                  | + | + | + | +   | +   | +   | +   | -   |
| R.H.♂                  | + | + | + | (+) | +   | -   | +   | -   |
| R.A.♀                  | + | + | + | (+) | -   | -   | (+) | -   |
| H.G.♂                  | + | + | + | +   | -   | -   | +   | +   |
| K.R.♂                  | + | + | + | +   | +   | +   | +   | +   |

Tabelle XIII: Die Verteilung der relevanten Protein-  
flecken im 2-D Gel bei den Fällen von LPI

| Protein Nr.<br>Patient | 1 | 2   | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------------------|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| Z.P.♂                  | - | -   | - | - | - | - | - | + |
| H.J.♀                  | - | -   | - | - | - | - | - | + |
| C.G.♂                  | - | (+) | - | - | - | - | - | + |
| K.M.♂                  | - | -   | - | - | - | - | - | + |
| N.W.♂                  | - | +   | + | - | - | - | - | + |
| T.F.♂                  | - | -   | - | - | - | - | - | + |
| Milz                   | - | -   | - | - | - | - | - | + |

In den Tabellen XII, XIII ist für jeden untersuchten Fall von B-CLL und LPI aufgelistet, welche Proteinflecken im 2-D Gel deutlich, angedeutet oder nicht erkennbar sind. Die Abkürzungen: + = deutlich erkennbar; (+) = schwach ausgeprägt; - = nicht identifizierbar.

Abbildung 10: 2-D Auftrennung der Proteine der myelom-  
leären Zellen je eines Falles von B-CLL und LPL



Abgebildet sind die 2-D Gele der Fälle M.A.♀ und Z.P.♂  
nach Färbung der Proteine mit Coomassieblau. Rechts im  
Bild die MG-Referenzproteine (MG in  $10^3$  d), oben der  
pH-Gradient. Die relevanten Gelbereiche sind umrandet.

M.A.♀

B-CLL



Z.P.♂

LPI



Abbildung 11: Ausschnittvergrößerung der relevanten Gelbereiche

Die Ausschnitte entsprechen den in Abbildung 10 markierten Bereichen. Die Nummern bezeichnen Proteine, auf die im Text eingegangen wird. Pfeile zeigen fehlende Proteinflecken an. A = Aktin

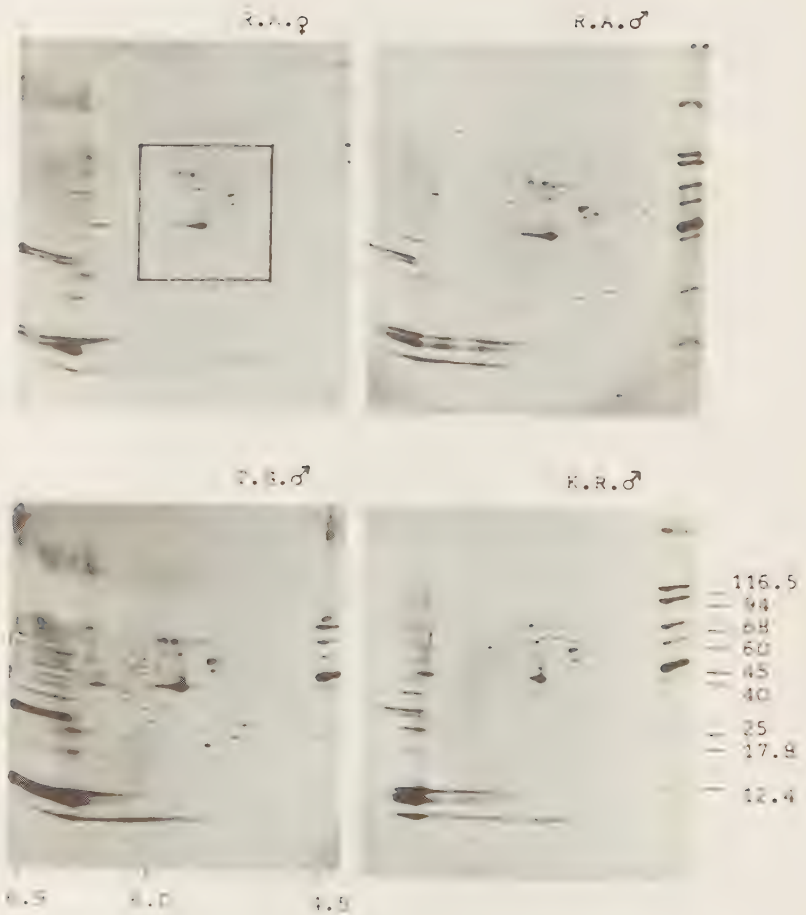


Abbildung 12: 2-D Proteinauftrennung bei vier Fällen von B-CLL

Abgebildet sind die 2-D Gele nach Färbung mit Coomassieblau. Rechts die MG-Referenzproteine, unten der pH-Gradient. Links oben ist der Ausschnitt der Abbildung 13 eingetragen.

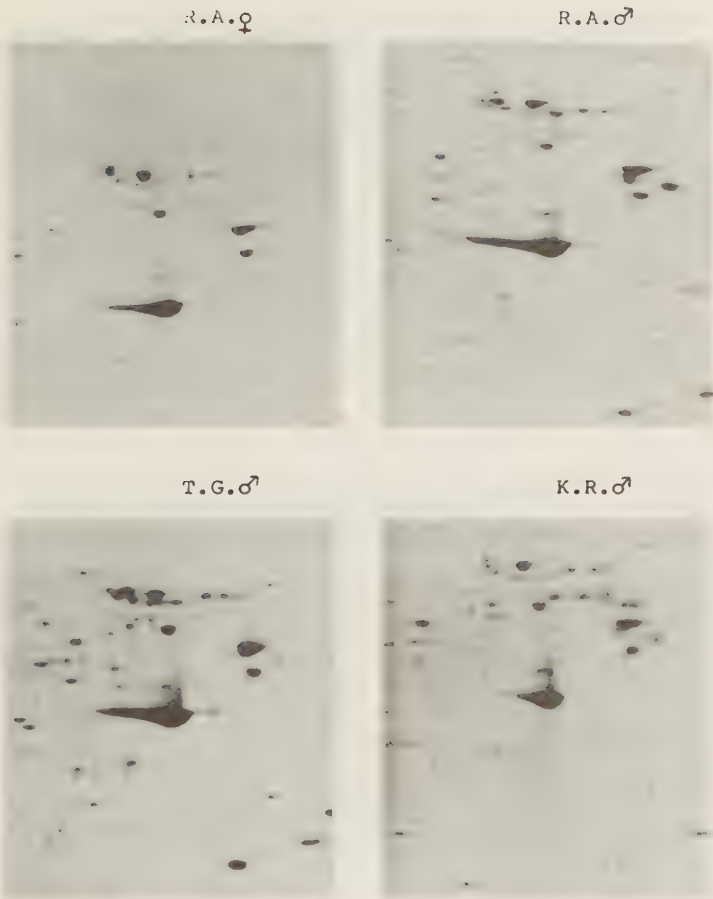


Abbildung 13: Ausschnittvergrößerung der relevanten  
Proteinflecken bei vier B-CLL-Fällen  
Die Ausschnitte entsprechen dem umrahmten Bereich in  
Abbildung 12 (Vgl. auch Abbildung 11).

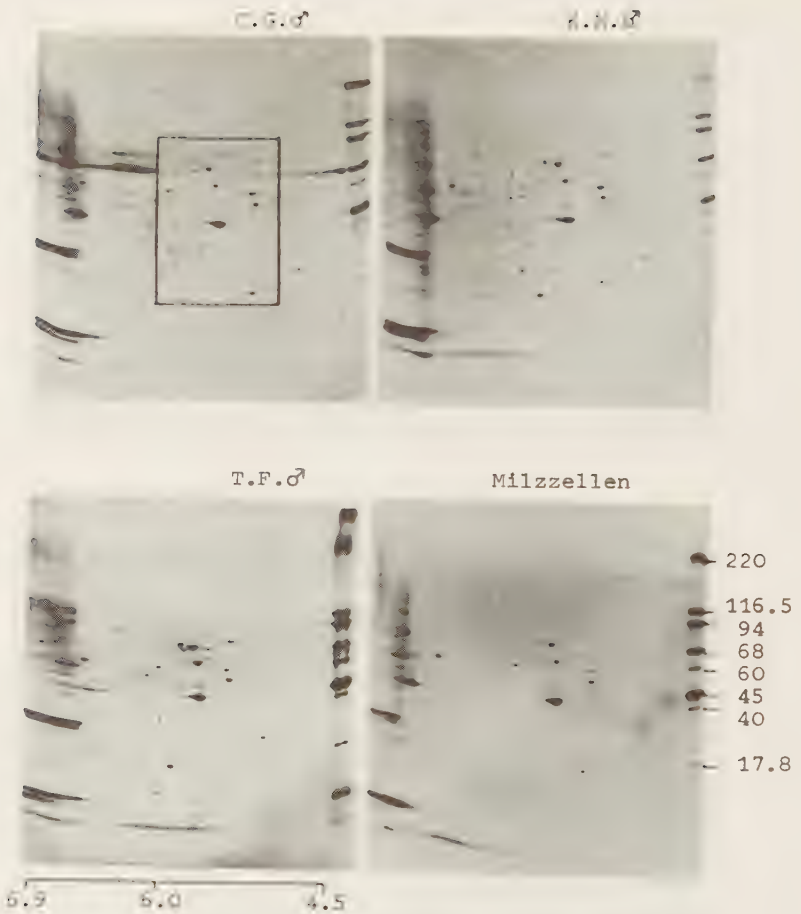


Abbildung 14: 2-D Proteinauftrennung bei vier Fällen von LPI

Abgebildet sind die mit Coomassieblau gefärbten 2-D Gele. Aufgetrennt wurden die Proteine der zirkulierenden Lymphozyten dreier Fälle mit leukämischem LPI und die Proteine der mononukleären Zellen einer Milz bei splenomegalen LPI. Rechts die MW-Referenzproteine, unten der pH-Gradient. Links oben ist der Ausschnitt der Abbildung 15 eingetragen.



Abbildung 15: Ausschnittvergrößerung der relevanten Proteinflecken bei vier LPI-Fällen

Die Ausschnitte entsprechen dem umrahmten Bereich in Abbildung 14.

rung des klinischen Verlaufs durch histologische Untersuchungen der Übergang in ein hoch-malignes Lymphom diagnostiziert worden. Die zugehörigen Befunde sind in den Abschnitten D.1.a bzw. b ausgeführt. Die Veränderung der biologischen Wertigkeit der Lymphomzellen hatte keinen Einfluß auf das für die jeweilige Grunderkrankung typische Proteilmuster (Abbildungen 13, 15).

Neben den mononukleären Leukozyten des Blutes von sechs Patienten mit einem Immunozytom wurden auch die mononukleären Zellen der exstirpierten Milz einer LPI-Patientin untersucht. Diese Zellen zeigten in der 2-D Gelelektrophorese ebenfalls den Proteinfleck Nr.8, während die Flecken Nr. 1 bis 7 fehlten. Das Bild wich damit in keiner Weise von der Proteinzusammensetzung zirkulierender maligner Zellen bei LPI ab (Abbildung 15).

Mit der verwendeten Technik werden im wesentlichen die Proteine erfaßt, deren MG zwischen 10000 und 200000 d und deren pI zwischen 4.5 und 6.9 liegt (Abbildungen 7, 8 und 10). Andere zelluläre Proteine diffundieren in der 1. oder 2. Dimension aus dem Gel, wie z.B. Histone mit pI-Werten im alkalischen Bereich, oder können nicht sauber aufgetrennt werden, wie Moleküle mit zu hohem MG.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die Probenmengen, welche in die Ampholigel-Elektrophorese eingesetzt werden sollten, anhand der Messung der Proteinkonzentration in den Zellysaten bestimmt und durch Auswertung der Größe des Flecks A (Aktin) in den resultierenden 2-D Gelen gegebenenfalls grob korrigiert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Proteine, die in dieser Ausführung der 2-D Gelelektrophorese erfaßt werden können, bei den B-CLL-Zellen einen etwas größeren Anteil an den gesamten zellulären Proteinen hatten als bei den LPI-Zellen. Dementsprechend wurden bei den B-CLL-Fällen durchschnittlich geringere Proteinmengen aufgetrennt

als bei LPI, nämlich zwischen ca. 80 und 120  $\mu\text{g}$  Protein bei der B-CLL und ca. 150 bis maximal 200  $\mu\text{g}$  bei LPI. Die Höhe dieser Werte mag im Vergleich zu den Angaben von O'Farrell überraschen, der Proteinmengen um 40  $\mu\text{g}$  empfahl (64). Allerdings trennte O'Farrell in seiner Arbeit Proteine von *Escherichia coli* auf. Im Unterschied zu diesen Bakterien dürfte jedoch in den eukaryonten menschlichen Zellen der Anteil neutraler und basischer Proteine wesentlich höher liegen. Zu dieser Erklärung paßt die Beobachtung, daß in den hier resultierenden 2-D Gelen auf der neutralen Seite die Proteine zu Streifen ausgezogen sind, also im Ampholigel nicht ausreichend scharf fokussiert wurden. Im überwiegenden Teil der 2-D Gele ist die Auftrennung dagegen in beiden Dimensionen scharf und gut reproduzierbar.

Insgesamt ist festzustellen, daß die B-CLL-Zellen im untersuchten Eiweißspektrum sieben Proteine zeigen, die bei LPI-Zellen nicht oder, wie die Proteine Nr. 2 und 3, nur ausnahmsweise anzutreffen sind. Der Vergleich der Tabellen XII und XIII hebt dies in der Zusammenstellung der Proteinverteilung bei B-CLL bzw. LPI anschaulich hervor. Andererseits bilden die LPI-Zellen ausnahmslos ein Protein (Fleck Nr.8), das bei der B-CLL nur in 6 von 12 Fällen auftrat. Die Natur dieser Proteine ist unbekannt. Weitergehende Untersuchungen wie z.B. die Bestimmung der Aminosäuresequenzen wären für einen Identitätsbeweis nötig.

Nachdem dieses Ergebnis herausgearbeitet war, stellte sich die Frage, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden zwischen B-CLL- und LPI-Zellen um qualitative oder quantitative Abweichungen handelt, d.h. ob die Proteine, die in den Gelen der LPI-Zellen fehlten, von diesen überhaupt nicht gebildet werden oder wegen zu geringer Konzentration in den konventionell gefärbten Gelen nicht nachweisbar sind. Schon O'Farrell zeigte, daß in der 2-D Gelelektrophorese die Ausbeute an identifizier-

baren Proteinen bei Anfertigung von Autoradiographien nach radioaktiver Markierung der Moleküle wesentlich höher ist als bei Anfärbung der Gele mit Coomassieblau(64). Das bedeutet, daß Proteinflecken erst ab einer bestimmten Größe durch Coomassieblau sichtbar gemacht werden können. Deshalb wird bei Zellen, die in Kultur züchtbar sind, meist die Technik der autoradiographischen Proteindarstellung nach Einbau markierter Aminosäuren vorgezogen (z.B.10,11). Bilden also LPI-Zellen die Proteine Nr. 1 bis 7 nicht oder aber in sehr geringer Konzentration?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Probenauftragsmenge bei LPI variiert. In Abbildung 16 ist beispielhaft der Fall H.J.♀ dargestellt. Hierbei wurden in die Ampholigel-Elektrophorese einmal ca. 180 µg Protein, eingesetzt, einmal ca. 350 µg. Das 2-D Gel, in dem die hohe Proteinmenge aufgetrennt wurde, läßt die Proteine Nr. 1 bis 7 deutlich erkennen, ebenso das bei LPI immer vorhandene Protein Nr. 8. Gleichzeitig macht sich die Überladung des Gels in einer deutlichen Verschlechterung der isoelektrischen Fokussierung bemerkbar. Bei geringerer Auftragsmenge erscheint dagegen nur das Protein Nr.8.

Die beschriebenen Unterschiede der Proteinmuster der B-CLL- und LPI-Zellen sind also nicht qualitativ, sondern quantitativer Art. Daraus geht hervor, daß die verwendete 2-D Technik unbedingt mit einer möglichst exakten Messung der Proteinkonzentration in den aufbereiteten Zellsaten zu kombinieren ist, um aussagekräftig zu sein. Wird diese Bedingung erfüllt, sind die Abweichungen zwischen B-CLL und Immunozytom signifikant und gut reproduzierbar.

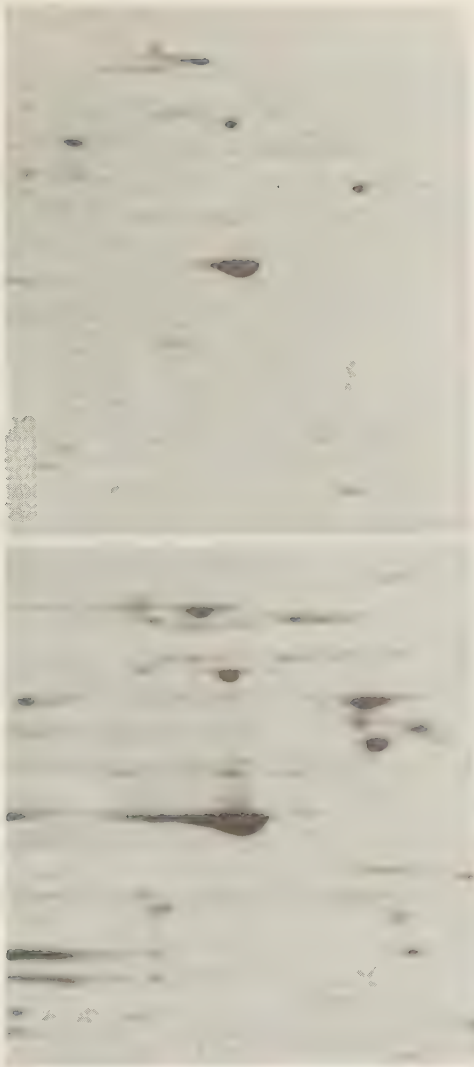


Abbildung 16: Ausschnittvergrößerungen aus den 2-D Auftrennungen des LPI-Falles H.J.o mit unterschiedlichen Probenauftragsmengen

Oben das Gel mit normaler Proteinbeladung, unten dasjenige mit extrem hoher Auftragsmenge. Beschreibung siehe Text. Die Ausschnitte entsprechen der Abbildung 14.

b) Die 2-D Proteinmuster niedrig-maligner NHL außer B-CLL und LPI

Neben B-CLL und LPI wurden drei weitere Fälle von lymphozytischen NHL und je zwei Fälle von zentroblastisch/zentrozytischen bzw. zentrozytischen NHL mit der Methode der 2-D Auftrennung der zellulären Proteine untersucht. Dabei handelte es sich um sechs Lymphome der B-Zellreihe mit leukämischem Verlauf und um eine CLL vom T-Typ. Die klinischen und diagnostischen Befunde dieser Fälle wurden in Abschnitt D.1.c dargestellt.

Die Proteinmuster auf den angefertigten 2-D Gelen stimmten in allen diesen Fällen weitgehend mit den Mustern überein, die bei B-CLL- bzw. LPI-Zellen zu finden waren. Insbesondere zeigte das einzige T-Zell-Lymphom keine Auffälligkeiten im Gesamtbild. Ebenso waren auch bei den vier erfaßten Keimzentrumlymphomen keine spezifischen Abweichungen zu beobachten. Alle untersuchten NHL-Zellen bilden also im Bereich MG 10000 bis 100000 d und pI 4.5 bis 6.9 im wesentlichen dieselben Proteine aus, was auf ihre sehr nahe Verwandtschaft hinweist.

Besonderes Interesse wurde den im letzten Abschnitt mit 1 bis 8 nummerierten Proteinen entgegengebracht, deren Auftreten B-CLL- und LPI-Zellen unterscheidet (siehe Tabelle XI). Die entsprechenden Ergebnisse der 2-D Gelelektrophorese bei den niedrig-malignen NHL außer B-CLL und LPI sind in Tabelle XIV zusammengestellt.

Die T-CLL zeigte die Proteinflecken Nr. 1 bis 3 und Nr. 8, dagegen traten die Proteine Nr. 4 bis 7 nicht auf (Abbildung 17). Die Zellen der beiden anderen lymphozytischen Lymphome besaßen im wesentlichen dasselbe Proteinmuster wie B-CLL-Zellen, wobei beidemal auch der Proteinfleck Nr. 8 nachweisbar war (Abbildungen 17 und 18). Von der Patientin H.K., die an einer PLL erkrankt war, wurden im Abstand von sechs Monaten zweimal

Tabelle XIV: Die Verteilung der relevanten Proteinflecken in den 2-D Gelen bei den NHL-Fällen außer B-CLL und LPI

| Patient<br>und Diagnose | Protein<br>Nr. | 1   | 2   | 3 | 4   | 5   | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------|----------------|-----|-----|---|-----|-----|---|---|---|
|                         |                |     |     |   |     |     |   |   |   |
| H.R.♂                   | T-CLL          | +   | +   | + | -   | -   | - | - | + |
| H.K.♀                   | PLL            | +   | +   | + | (+) | (+) | - | + | + |
|                         |                | +   | +   | + | +   | +   | + | + | + |
| M.A.♀                   | HZL            | +   | +   | + | -   | (+) | + | + | + |
| K.F.♀                   | M.L.cb/cc      | +   | +   | + | +   | +   | + | + | + |
| V.J.♀                   | M.L.cb/cc      | +   | (+) | + | -   | +   | + | + | - |
| B.K.♀                   | M.L.cc         | +   | +   | + | -   | -   | - | - | - |
| F.U.♂                   | M.L.cc         | (+) | -   | - | -   | -   | - | - | - |

In Tabelle XIV ist für jeden der in den Tabellen VIII und IX beschriebenen NHL-Fälle aufgelistet, welche Proteinflecken im zugehörigen 2-D Gel deutlich, angedeutet oder nicht erkennbar waren. Die Nummern der Proteinflecken stimmen mit der Tabelle XI überein. Die Abkürzungen: + = deutlich erkennbar; (+) = nur schwach ausgeprägt; - = nicht identifizierbar.

die mononukleären Zellen des Blutes untersucht. Dabei stand die Patientin zunächst unter zytostatischer Therapie, während bei der zweiten Blutentnahme die letzte Behandlung mehrere Wochen zurücklag (Tabelle VIII). Die erhaltenen Proteinmuster stimmten fast vollkommen überein (Abbildung 18).

Ebenso war auch das 2-D Proteinmuster der beiden zentroblastisch/zentrozytischen Lymphome demjenigen der B-CLL gleich. In einem Fall waren die Proteinflecken Nr.1 bis 8 komplett nachweisbar, im zweiten fehlten nur die Flek-

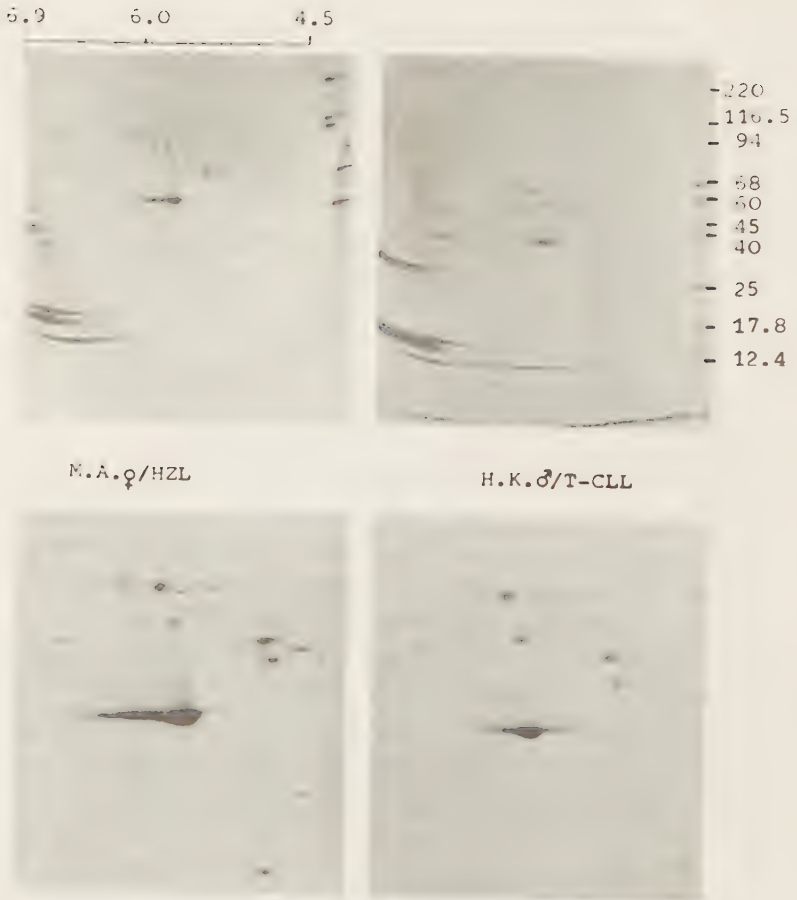


Abbildung 17: 2-D Auftrennung der zellulären Proteine  
je eines Falles von HZL und T-CLL

Dargestellt ist je ein Übersichtsbild und eine Ausschnitt-  
vergrößerung, die der Abbildung 12 entspricht.

Rechts die MG-Referenzproteine, oben der pH-Gradient.

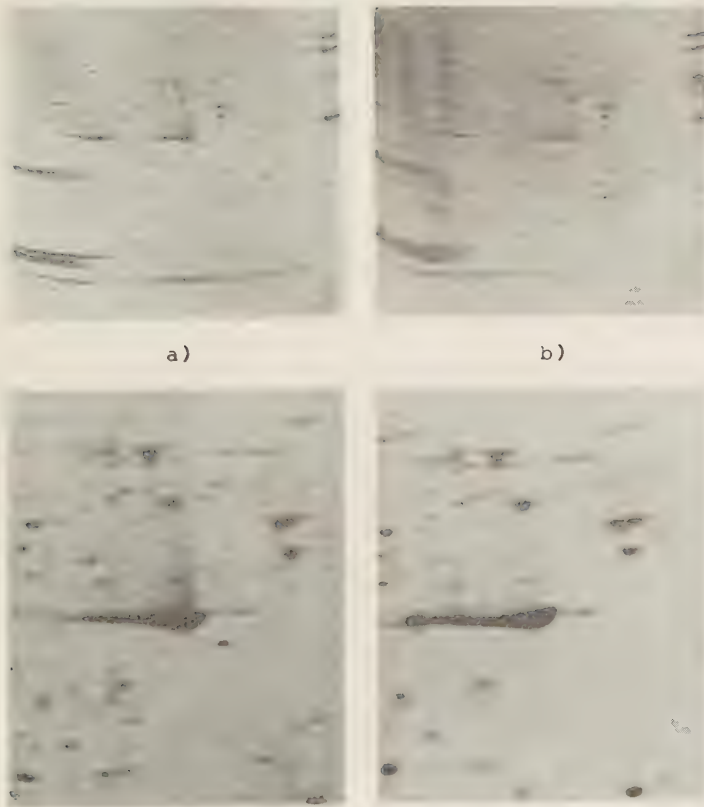


Abbildung 18: 2-D Auftrennung der zellulären Proteine eines PLL-Falles

a: Übersichtsbild und Ausschnittsvergrößerung des 2-D Gels des Falles H.K.♀/PLL; b: Entsprechende Ergebnisse des gleichen Falles nach erneuter Blutentnahme im Abstand von 6 Monaten. MG-Referenzproteine und pH-Gradient siehe Abbildung 17.

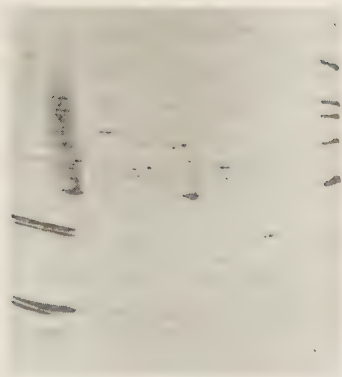


Abbildung 19: 2-D Auftrennung der zellulären Proteine  
zweier Fälle von cb/cc Lymphom

Dargestellt ist je ein Übersichtsbild oben und eine der Abbildung 12 entsprechende Ausschnittvergrößerung unten. MG-Referenzproteine und pH-Gradient siehe Abbildung 17.



B.K.♀



F.U.♂



Abbildung 20: 2-D Auftrennung der zellulären Proteine  
zweier Fälle von cc Lymphom

Weitere Angaben siehe Abbildung 19.

ken Nr.4 und 8 (Abbildung 19).

Demgegenüber zeigten die zentrozytischen Lymphome ein anderes Bild. Hier waren in einem Fall die Flecken Nr. 1 bis 3 anfärbbar, im anderen war gar nur das Protein Nr. 1 angedeutet sichtbar. Die Proteinverteilung ähnelte also dem Muster von LPI-Zellen, allerdings mit dem Unterschied, daß der Proteinfleck Nr. 1 vorhanden war und das Protein Nr. 8 fehlte.(Abbildung 20).

Mit dem Vorbehalt, daß hier neben B-CLL und LPI nur jeweils ein oder zwei Fälle der anderen NHL-Entitäten untersucht wurden und deshalb aus einzelnen Abweichungen keine sicheren verallgemeinernden Rückschlüsse auf spezifische Proteinmuster dieser Lymphome erlaubt sind, läßt sich zusammenfassend feststellen, daß der Nachweis der Proteinflecken Nr. 1 bis 7 in der 2-D Gelelektrophorese für das Vorliegen eines NHL vom B-Typ der Klassen "M.L.lymphocytic" oder "M.L.centroblastic/centrocytic" der Kieler Nomenklatur spricht. Dagegen zeigen die malignen Zellen des "M.L.lymphoplasmacytoid" und des "M.L.centrocytic" die Mehrzahl dieser Proteine nicht. Insbesondere der Nachweis des Proteins Nr. 8 spricht stark für die Diagnose LPI, falls gleichzeitig die Proteine Nr. 1 bis 7 fehlen.

#### c) Das 2-D Proteinmuster normaler Lymphozyten

Neben malignen Zellpopulationen von NHL-Patienten wurden auch die zellulären Proteine der mononukleären Leukozyten gesunder Spender aufgetrennt. Außerdem wurden die mononukleären Zellen einer Kontrollperson in T- und B-Zell-Fraktionen separiert und diese ebenfalls in der 2-D Gelelektrophorese untersucht. Die erhaltenen, wiederum sehr komplexen Proteinmuster ergaben eine bemerkenswerte Homologie mit den Mustern maligner Lymphomzellen.

Daneben zeigten die gesunden Lymphozyten jedoch einige neue Proteine. Auffallend war vor allem eine Gruppe von Proteinflecken im Bereich MG 90000 bis 93000 d und pI zwischen 5.9 und 6.2. Keines der untersuchten Lymphome bildete diese Proteine. Weiter konnten zwei Proteine mit dem ungefähren MG 26000 d und pI 5.2 identifiziert werden, die in malignen Zellen meist ebenfalls nicht, gelegentlich angedeutet ausgebildet waren. Alle diese Proteine gehören zu der Fraktion der B-Zellen. Sie kommen in T-Lymphozyten nicht vor (Abbildung 21). Ob sie aber den B-Lymphozyten selbst zuzuordnen sind oder von anderen Zellen stammen, die in der B-Fraktion mitenthalten waren, wie z.B. Monozyten, kann nicht endgültig beantwortet werden. Hirsch et al. beschrieben jüngst die Proteinmuster verschiedener mononukleärer Zellen in einer 2-dimensionalen Minigel-Elektrophorese, u.a. von normalen Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten (31). Sie zeigten, daß sich die einzelnen Leukozytenspezies durch die Verteilung der zellulären Proteine in 2-D Gelen voneinander abgrenzen lassen. Die von dieser Forschungsgruppe veröffentlichten Abbildungen und Ausführungen legen die Vermutung nahe, daß die oben geschilderten Proteine im Bereich MG um 90000 und pI um 6.0 am ehesten lymphatischen Zellen zuzuordnen sind.

Weiter zeigte die B-Zell-Fraktion die in den vorangegangenen Abschnitten mit den Nummern 1 bis 8 bezeichneten Proteine in vollständiger Zahl; dagegen prägten die T-Lymphozyten nur die Proteine Nr. 1 bis 3 und 8 aus, wie es auch bei den Zellen der CLL vom T-Typ zu beobachten war (Abbildungen 17 und 21).

Hirsch et al. wiesen auf ein Protein mit dem MG 36000 d und pI 6.2 hin, welches sie in malignen B-Zellen, z.B. CLL- und HZL-Fällen, fanden, während es normalen Lymphozyten fehlte (31). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie nicht nachvollzogen werden. Möglicher-

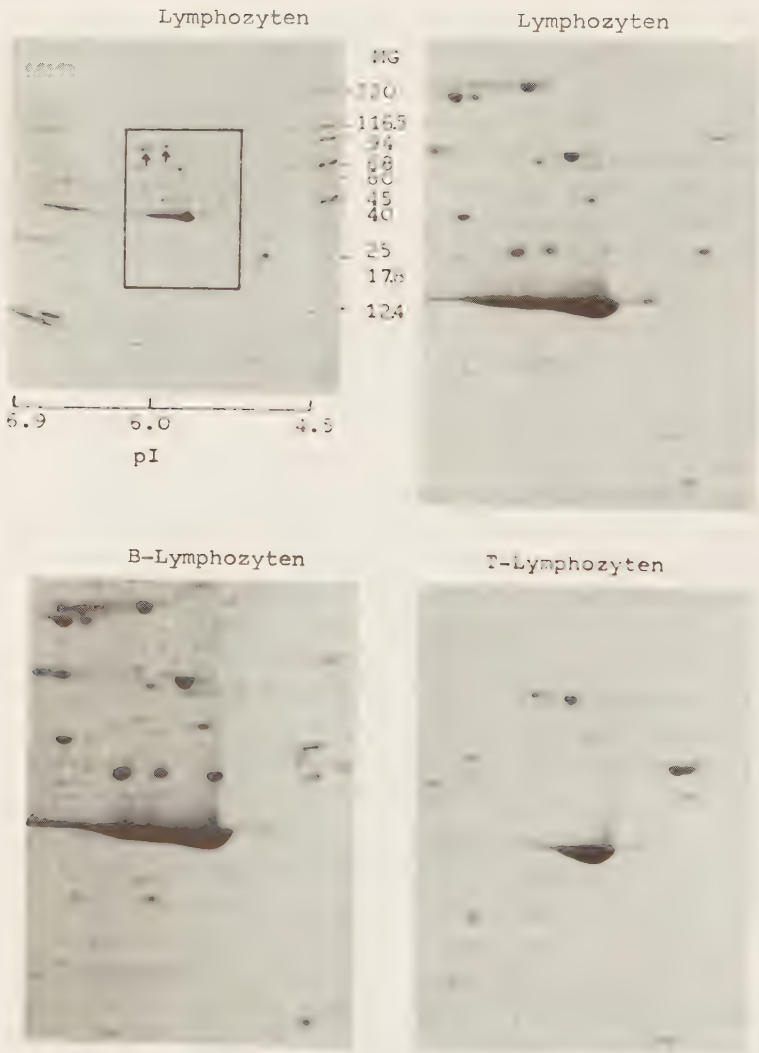


Abbildung 21 Das 2-D Proteinmuster normaler Lymphozyten

Dargestellt sind die Proteine der Lymphozyten im Übersichts-  
 bild und in einer Ausschnittsvergrößerung sowie  
 die Proteine der Subpopulationen in Ausschnitten ent-  
 sprechend dem umrahmten Bereich. Die Pfeile weisen auf  
 Proteine hin, die nur normale Lymphozyten zeigen (s. Text).

weise ist dies mit Unterschieden in der Menge aufgetrennter Proteine zu erklären, welche, wie gezeigt wurde, eine große Rolle bei der Interpretation konventionell gefärbter 2-D Gele spielt.

#### d) Schlußfolgerungen

Die Proteinanalyse maligner Zellpopulationen aus dem Blut verschiedener NHL-Fälle in der 2-D Gelelektrophorese führte zur Darstellung neuer, bisher nicht beschriebener Proteine, deren Auftreten sich mit bestimmten Lymphomentitäten korrelieren ließ. Die Proteine Nr. 1 bis 8 werden von zirkulierenden lymphatischen Zellen des B-Typs gebildet. Sie konnten ebenfalls vollständig oder mehrheitlich in allen untersuchten B-CLL-Zellen nachgewiesen werden. Weiter wurden sie bei einzelnen Fällen anderer lymphozytischer und zentroblastisch/zentrozytischer Lymphome der B-Reihe gefunden.

Von diesem Bild wich die Zusammensetzung der Proteine bei LPI ab. Die Zellen dieses Lymphoms bildeten typischerweise nur das Protein Nr. 8 in nachweisbarer Menge, jedoch nicht die Proteine Nr. 1 bis 7. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Ergebnis davon abhängt, daß pro 2-D Gel nicht mehr als etwa 200 µg der Proteine aus LPI-Zellen aufgetrennt werden. Ist diese Voraussetzung erfüllt, läßt sich das LPI in der 2-D Gelelektrophorese mit großer Sicherheit von der B-CLL, außerdem wahrscheinlich auch von anderen lymphozytischen und von zentroblastisch/zentrozytischen Lymphomen abgrenzen.

Ein dem LPI ähnliches Proteinmuster konnte nur bei zwei zentrozytischen Lymphomen gefunden werden. Inwieweit die hierbei beobachteten geringen Abweichungen von dem für LPI typischen Bild eine Abgrenzung erlauben, kann nicht abschließend beantwortet werden. Es wären weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen nötig. Die Dif-

ferentialdiagnose zwischen LPI und cc Lymphom macht jedoch mit den bisher bekannten Methoden kaum Schwierigkeiten.

Die Proteine Nr. 4 bis 7 konnten weder in normalen noch in neoplastischen Zellen des T-Typs demonstriert werden. Durch die Bildung der Proteine Nr. 1 bis 3 in nachweisbaren Mengen unterschieden sich die T-Zellen dennoch von den Zellen der Immunozytome.

Schließlich ist festzustellen, daß in dieser Studie nur die deutlich ausgeprägten Veränderungen der beschriebenen Proteine ausgewertet wurden. Darüberhinaus waren zahlreiche quantitative Unterschiede einzelner Proteinflecken zu beobachten. Es erscheint jedoch wenig sinnvoll, diese Abweichungen zu berücksichtigen, da die untersuchten Zellsysteme eine zu große biologische Variationsbreite von Fall zu Fall zeigen. Die Grenzen der beschriebenen Methode sind vor allem in der Tatsache begründet, daß in dieser 2-D Technik nur die Proteine mit Molekulargewichten zwischen etwa 200000 und 10000 d erfaßt werden. Deren Anteil an der Gesamtheit der zellulären Proteine schwankt jedoch offensichtlich in relativ weiten Grenzen.

## E. DISKUSSION

Die Kenntnisse über das lymphatische Zellsystem, den Träger der spezifischen zellulären und humoralen Immunabwehrmechanismen des Körpers, wurden in den letzten Jahrzehnten erheblich erweitert. Parallel dazu nahm auch das Wissen um die Neoplasien dieses Systems zu, die unter der Bezeichnung maligne Lymphome (m.L.) zusammengefaßt werden. Von ihnen entfallen je etwa die Hälfte auf den Morbus Hodgkin und die malignen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).

Der Ausschlußbegriff NHL umfaßt seit langem alle malignen Lymphknotentumoren, die von lymphatischem Gewebe ausgehen, mit Ausnahme der Lymphogranulomatose. Diese heterogene Krankheitsgruppe wurde zunächst allein aufgrund anatomischer und klinischer Beobachtungen unterteilt. Auf dieser Basis wurde auch die weit verbreitete Klassifikation von Rappaport erstellt, die den meisten abgeschlossenen NHL-Studien zugrundeliegt (70,71). In neuerer Zeit führten immunologische und zytochemische Befunde zu einer geänderten Betrachtung der NHL. So entstanden mehrere neue Einteilungskonzepte. Davon setzte sich in Deutschland und in einigen europäischen Tumorzentren die von Lennert und Mitarbeitern vorgeschlagene Kiel Klassifikation durch, die mehrmals aktualisiert und vervollständigt wurde (27,50-52). Durch die Analyse der Überlebenszeiten von NHL-Patienten nach Diagnosestellung konnte gezeigt werden, daß die Entitäten der Kiel Klassifikation gut mit verschiedenen Prognosegruppen korrelieren. Insgesamt erscheinen sie homogener als die Klassen von Rappaport und haben damit höhere prognostische Aussagekraft (13-16,44, 58,60,61).

Beide Klassifikationen sind jedoch nicht unumstritten. So wird z.B. diskutiert, ob das LPI der Kiel Klassifikation zu Recht als eigene Entität von den lymphozytischen Lymphomen vom B-Typ einschließlich der B-CLL abgegrenzt wird.

Die gut differenzierten lymphozytischen Lymphome und das Immunozytom werden in der amerikanischen Klassifikation nicht unterschieden. Sie stellen zusammen den Hauptanteil der m.L.DWDL Rappaports (44). Dagegen wird die CLL von den NHL abgegrenzt, wenn keine ausgeprägten Lymphknotentumoren entwickelt sind, obwohl die lymphozytischen Lymphome und die CLL meist identische histologische Bilder zeigen. Insgesamt wird von Rappaport und Mitarbeitern trotz fließender Übergänge an der generellen Unterscheidung von drei Gruppen lymphoproliferativer Krankheiten mit gut differenzierter Histologie festgehalten. Es sind dies die gut differenzierten lymphozytischen Lymphome (M.L.DWDL und DPDL), die chronische lymphatische Leukämie und die lymphoproliferativen Erkrankungen mit monoklonaler Gammopathie (65). Innerhalb der M.L.DWDL bzw. DPDL wird außerdem zusätzlich nach rein morphologischen Kriterien zwischen Formen mit und solchen ohne plasmazytoide Komponente (18,62).

Die Abgrenzung des LPI in der Kiel Klassifikation erscheint jedoch berechtigt, da in retro- und prospektiven Studien der Kieler Lymphomgruppe deutliche Abweichungen im klinischen Bild und in der Prognose zwischen LPI und der B-CLL, die den größten Teil der lymphozytischen Lymphome vom B-Typ im Sinne Lennerts stellt, herausgearbeitet werden konnten (29,78,79). Umstritten ist allerdings weiterhin, ob die plasmazytoiden Zellen bei den Immunozytomen Teil der malignen Population sind oder ob, zum mindesten in einigen Fällen, nur eine reaktive Vermehrung dieser Zellen vorliegt (39,43).

Fu et al. brachten einen neuen Aspekt in die Diskussion. Sie berichteten, daß sich in vivo in ihrer Entwicklung weitgehend blockierte leukämische B-Lymphozyten in vitro unter dem Einfluß normaler T-Lymphozyten in hohem Prozentsatz in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen differenzieren. Dagegen konnten die T-Zellen ihrer CLL-Fälle diese Helferfunktion nicht übernehmen. Dieser T-Zell-Defekt

wurde bei Morbus Waldenström nicht gefunden (26). Gegen diesen Unterschied zwischen CLL und Waldenströms Krankheit ist allerdings einzuwenden, daß bei den zwei von Fu et al. beschriebenen CLL-Fällen auch in vivo einige lymphoplasmazytoide Zellen im Blut zirkulierten. Beide Patienten besaßen außerdem ein monoklonales IgM-Paraprotein im Serum, wenn auch in schwacher Ausprägung. Im Sinne der Kiel Klassifikation sind sie damit wohl als LPI mit teilweiser Blockierung der Ig-Sekretion einzuordnen.

Insgesamt ist festzustellen, daß die grundsätzliche Berechtigung der Abgrenzung des LPI von den lymphozytischen B-Zell-Lymphomen aufgrund funktioneller Unterschiede der proliferierenden Zellen weiterhin kontrovers beurteilt wird.

Das LPI ist von der Kieler Lymphomgruppe definiert als niedrig-malignes Lymphom, dessen Zellen teilweise zur Bildung sekretorischer Immunglobuline (Ig) fähig sind, teilweise nicht. Es steht funktionell zwischen der B-CLL, deren Zellen grundsätzlich nur nicht-sekretorisches Ig bilden, welches an die Zellmembran gebunden wird, und dem Plasmozytom, dessen Zellen ausnahmslos zur Bildung sekretorischer Ig in der Lage sind. Klinisch steht die Abgrenzung von der B-CLL im Vordergrund. Diese ist besonders bei den etwa zwei Dritteln der LPI-Fälle schwierig, die mit einer Leukämie einhergehen. Nur wenige Methoden mit eindeutigen Ergebnissen stehen hierzu zur Verfügung. An erster Stelle ist die histologische Untersuchung eines Lymphknotens, ersatzweise auch die des Knochenmarks zu nennen. An Schnittpräparaten ist auch die PAS-Reaktion aussagekräftig. Die plasmazytoiden Zellen sind globulär PAS-positiv. Demgegenüber sind gewebeständige B-CLL-Zellen PAS-negativ. Weiter kommt dem Nachweis von CIg große Bedeutung zu, der in Organschnitten und in Blutaussstrichen möglich ist und ein LPI sichert. Als zusätzliche Möglichkeit, ein LPI zu diagnostizieren, steht der elek-

tronenmikroskopische Nachweis von ergastoplasmatischem Retikulum in einem Teil der Tumorzellen als Zeichen für die sekretorische Tätigkeit zur Verfügung (52,81).

Es gibt also nur relativ wenige Kriterien, die für eine sichere Unterscheidung des LPI von der B-CLL heranzuziehen sind. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Suche nach neuen Merkmalen dieser beiden Lymphome, zum einen als Diagnosehilfe, zum anderen als Argument für ihre Abgrenzung als essentiell verschiedene Krankheiten.

Wir gingen dieses Ziel mit proteinchemischen Techniken an und verwendeten eine 2-dimensionale Kombination zweier bereits für sich hoch auflösender gelelektrophoretischer Trennsysteme. Diese Methode gewährleistet auch bei sehr komplexen Proteingemischen eine genaue und gut reproduzierbare Auftrennung. Gleichzeitig liefert sie für jedes Protein mit dem MG und dem pI zwei wichtige biochemische Parameter (65).

Als Untersuchungsobjekt wurden die mononukleären Zellen des Blutes von Patienten mit B-CLL oder der leukämischen Verlaufsform des LPI ausgewählt. Dadurch wurden Zellpopulationen erfaßt, die mit Sicherheit als maligne angesehen werden dürfen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen der B-CLL einige Proteine (Nr.1 bis 7) aufweisen, welche bei LPI nicht (Nr.1, 4 bis 7) oder nur vereinzelt (Nr.2,3) anzutreffen sind. Die B-CLL-Lymphozyten prägten dabei nicht in jedem Fall alle diese Proteine in kompletter Reihe aus, sondern bildeten gelegentlich nur einige davon. Die Flecken Nr.1, 3 und 4 waren jedoch in jeder 2-D Auftrennung von B-CLL-Zellen zu erkennen. Demgegenüber zeigten die LPI-Zellen ausnahmslos ein Protein (Nr.8), das bei der B-CLL nur in der Hälfte der Fälle gefunden wurde. Besonders charakteristisch für LPI war die Verteilung Protein Nr.8 positiv und Nr.1 bis 7 negativ. Für die Unterscheidung zwischen

B-CLL und LPI spielt also vor allem das Gesamtbild des 2-D Gels eine Rolle (Tabelle XII und XIII)

Nachdem sich diese Differenzen im Spektrum der zellulären Proteine gezeigt hatten, stellten sich zwei weiterführende Fragen:

1. Handelt es sich bei dem Fehlen der Proteine Nr.1 bis 7 bei LPI um eine quantitative oder qualitative Abweichung von der B-CLL, d.h. werden die betreffenden Proteine von LPI-Zellen überhaupt nicht oder nur in Mengen, die unterhalb der Nachweisgrenze der 2-D Gelelektrophorese liegen, gebildet ?
2. Wie verhalten sich die Zellen anderer niedrig-maligner NHL im Hinblick auf diese Proteine ? Zeigen B-CLL und/oder LPI ein spezifisches Proteilmuster, das bei anderen NHL nicht auftritt ?

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde die Proteinmenge, die in zwei Dimensionen aufgetrennt werden sollte, bis zur Auflösungsgrenze des Gelsystems erhöht. Unter dieser Bedingung ließen sich die Proteine Nr. 1 bis 8 auch bei LPI mehrheitlich oder komplett mit Coomassieblau darstellen. Die Proteine Nr. 1 bis 7 liegen also auch bei LPI vor, allerdings in gegenüber der B-CLL deutlich reduzierter Menge. Es war schon vorher aufgefallen, daß der Anteil der in der 2-D Gelelektrophorese erfaßten an den gesamten zellulären Proteinen bei LPI-Zellen im Durchschnitt niedriger lag als bei B-CLL-Zellen. Als Erklärung dieses Phänomens bieten sich Unterschiede in der Kern-Plasma-Relation zwischen lymphozytoiden und lymphoplasmazytoiden Zellen an. Die Konzentrationsabnahme der Proteine Nr. 1 bis 7 geht jedoch über die allgemeine Reduktion der Proteine mit pI im sauren pH-Bereich bei LPI deutlich hinaus. Bemerkenswert ist, daß dieser Befund auch an den infiltrierenden mononukleären Zellen einer exstirpierten Milz bei splenomegalem Immunozytom zu zeigen war.

Zusammenfassend kann der Schluß gezogen werden, daß die 2-D Gelelektrophorese geeignet ist, die B-CLL und das leukämische LPI anhand des Proteinmusters der mononukleären Blutleukozyten voneinander abzugrenzen. Bedingung ist, daß eine Obergrenze von ca. 200 µg zellulärer Gesamtproteine je Auftrennung nicht überschritten wird.

Zur Beantwortung der zweiten Frage wurden die Proteine von anderen lymphozytischen, von zentroblastisch/zentrozytischen und zentrozytischen NHL aufgetrennt, außerdem auch diejenigen der mononukleären Zellen gesunder Kontrollpersonen. Hierbei ergab sich, daß andere lymphozytische Lymphome vom B-Typ und ebenso die untersuchten zentroblastisch/zentrozytischen Lymphome in Hinblick auf die Verteilung der Proteine Nr. 1 bis 8 keine Abweichungen von der B-CLL zeigten. Demgegenüber wiesen die zentrozytischen Lymphome ein Bild auf, das im wesentlichen dem LPI glich, mit dem Unterschied, daß das Protein Nr.1 nachweisbar war und das Protein Nr.8 fehlte. Ob dieser Abweichung differentialdiagnostische Aussagekraft zukommt, kann bei der geringen Zahl der Untersuchungen nicht entschieden werden. Die Fraktion der mononukleären Zellen gesunder Spender wies anders als alle untersuchten malignen Zellpopulationen, einige Proteine mit hohem MG auf. Besonders auffallend war eine Gruppe von Proteinen mit MG um 90000 und pI um 6.0 . Die Separierung von B- und T-Lymphozyten über Ficoll-Isopaque nach Rosettenbildung mit Schafserythrozyten ergab, daß diese Proteine wahrscheinlich den B-Lymphozyten zuzuordnen sind. Weiter zeigten beide Lymphozytenfraktionen die Proteine Nr. 1 bis 3 und Nr. 8, während die Proteine Nr. 4 bis 7 nur in den B-Zellen auftraten. In einem Fall von CLL des T-Typs fehlten ebenfalls die Proteine Nr.4 bis 7.

Für die Interpretation dieser Ergebnisse ist es notwendig, auf das B-Lymphozyten-System näher einzugehen. In Abbildung 22 ist ein verkürztes und vereinfachtes hypo-

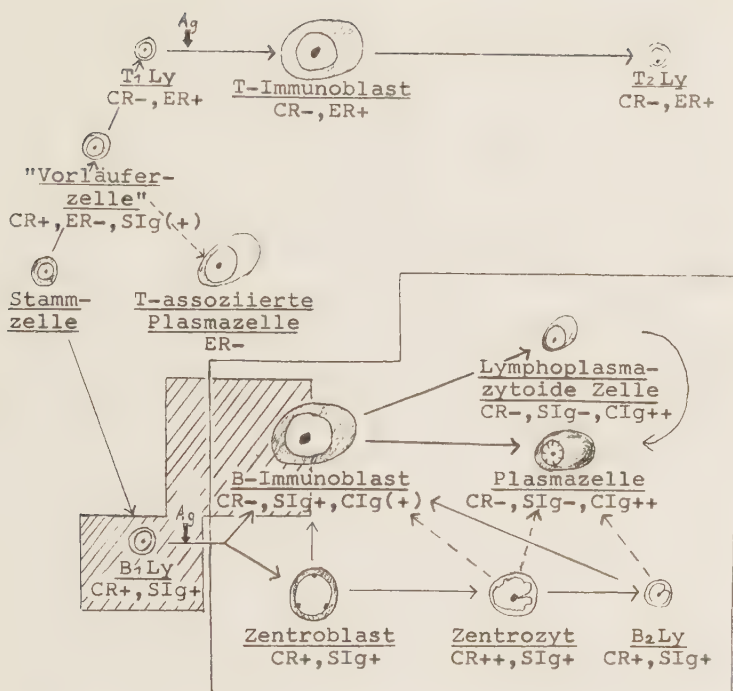


Abbildung 22: Hypothetischer Ursprung der Tumorzellen bei B-CLL und LPI

Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema des T- und B-Lymphozyten-Systems nach Lennert (51). Die Zellen im oberen Teil der Abbildung sind Träger der Zell-vermittelten Immunität, diejenigen im unteren Teil sind Träger der humoralen Immunität.

Im gestrichelten Feld stehen die Zellen, von denen die B-CLL ihren hypothetischen Ausgang nimmt. Im einfach umrahmten Feld befinden sich die Zellen, von denen der polymorphe Subtyp des LPI abgeleitet wird. Von diesen kommen für den Ursprung des lymphoplasmazytischen Subtyps der B-Immunoblast, die Plasmazelle und der B<sub>2</sub>Lymphozyt in Frage, für den des lymphoplasmazytoiden Subtyps der B-Immunoblast, die lymphoplasmazytoide Zelle und der B<sub>1</sub>Lymphozyt (52).

Abkürzungen: Ly = Lymphozyt; CR = Komplement-Rezeptor; ER = Schafseriesythrozyten-Rezeptor; SIg bzw. CIg = Membrangebundenes bzw. zytoplasmatisches Immunglobulin.  
→ = gesicherte ..; --> = vermutete Differenzierungsrichtung.

thetisches Schema der Entwicklung der lymphatischen Zellen dargestellt (50,51). Ausgehend von einer nicht genau charakterisierten Stammzelle kommt es ohne Antigenkontakt sowohl im T- als auch im B-Zell-System zur Entwicklung von reaktionsbereiten Lymphozyten ( $T_1$ - bzw.  $B_1$ -Lymphozyten). Nach Antigenstimulation entstehen aus diesen Zellen Immunoblasten. In der B-Reihe entstehen aus den B-Immunoblasten über Plasmoblasten und Proplasmazyten oder über lymphoplasmazytoide Zellen die Immunglobulinsezernierenden Plasmazellen. Eine weitere Reaktionsmöglichkeit ist die Bildung von Keimzentren in lymphatischen Geweben, in enger Kooperation mit verschiedenen T-Zellen. Diese Entwicklung verläuft via Zentroblast und Zentrozyt zu den  $B_2$ -Lymphozyten, den sogenannten "Gedächtniszellen" der B-Reihe (entsprechend den  $T_2$ -Lymphozyten in der T-Reihe). Bei erneutem Antigenkontakt differenzieren sich die  $B_2$ -Lymphozyten mit höherer Geschwindigkeit und Intensität über Immunoblasten und weitere Vorstufen zu Plasmazellen. Wahrscheinlich ist dies sogar unter Umgehung der Immunoblasten möglich. Als Folge setzt die Antikörperbildung früher ein und erreicht höhere Werte als bei Erstkontakt mit dem verantwortlichen Antigen.

Durch Vergleich der zellulären Eigenschaften kann versucht werden, die proliferierenden Zellen von NHL bestimmten Stufen der normalen Entwicklungsreihe zuzuordnen (7,37,42,52). Auf dieser Basis schlug die Kieler Lymphomgruppe die Ableitung der B-CLL-Zellen von  $B_1$ -Lymphozyten vor, während sie für alle Subtypen des LPI enge Beziehungen zu  $B_2$ -Lymphozyten postulierte. Dementsprechend liegt bei der B-CLL im Sinne der Kiel Klassifikation eine Blockierung der Differenzierung in Immunglobulin sezernierende Zellen vor. Bei LPI ist dies nicht der Fall; es entstehen maligne Zellen, die sekretorische Immunglobuline bilden. Allerdings ist in 75 % der Immunozytome die Sekretion dieser Antikörper gestört (52).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich das LPI durch die deutlich verminderte Bildung einiger Proteine in den neoplastischen Zellen von der B-CLL, anderen lymphozytischen Lymphomen mit B-Charakteristika und von zentroblastisch/zentrozytischen Lymphomen unterscheidet. Von diesen Lymphomen wird nur die Haarzellen-Leukämie mit B<sub>2</sub>-Lymphozyten in Verbindung gebracht. Einen weitgehend dem LPI gleichenden Befund zeigten nur die zentrozytischen Lymphome. Interessanterweise ist der Zentrozyt neben dem B<sub>2</sub>-Lymphozyten die einzige B-Zelle, für die die Kieler Lymphomgruppe eine direkte Entwicklungsmöglichkeit zu Plasmazellen postuliert, während den B<sub>1</sub>-Lymphozyten und den Zentroblasten diese Fähigkeit nicht zukommen soll. Möglicherweise stehen die beschriebenen Proteine (Nr.1 bis 8) in Beziehung zu dieser funktionellen Eigenschaft.

Bei diesen Polypeptiden handelt es sich nicht um Immunglobulinketten. Wir konnten durch <sup>125</sup>J-markiertes Protein A mit Anti-IgG- und Anti-IgM-Antikörpern beladene Ig-ketten darstellen, nachdem die zellulären Proteine mit einer Blotting-Technik (17) aus 2-D Gelen auf Nitrozellulosefolien überführt worden waren. Leichte und schwere Ig-Ketten wandern am alkalischen Rand der 2-D Gele im Bereich pI 6.9 bis etwa 6.3, nicht jedoch im Bereich der Proteine Nr. 1 bis 8 (Nicht dargestellte Ergebnisse). Weitere Aussagen über die Natur der Proteine Nr. 1 bis 8 sind derzeit nicht möglich. Es wäre deshalb interessant, durch weiterführende Untersuchungen ihre Natur aufzuklären.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß mit der 2-D Gelelektrophorese nur große Zellpopulationen untersucht werden können, d.h. die Proteinausstattung der einzelnen Zellen wird sozusagen gemittelt dargestellt. Variationen, die nur an einem kleinen Prozentsatz der Zellen

eines Lymphoms auftreten, werden in dieser Technik sicherlich verdeckt. Die Methode wurde deshalb bisher vor allem auf nicht verwandte Zellsysteme angewendet, z.B. zum Vergleich lymphatischer und myeloischer Leukosen (31), oder zur Suche nach biochemischen Veränderungen als Folge einer Transformation mit Tumorstämmen (z.B.11). In dieser Arbeit konnten jedoch auch in den eng verwandten, niedrig-malignen Lymphomzellen des B-Typs Unterschiede im Proteinmuster herausgearbeitet werden, was die großen Möglichkeiten der 2-D Gelelektrophorese bestätigt. Bedenkt man insbesondere die weitgehende Homologie des Proteinmusters bei allen untersuchten lymphatischen Zellen, so liegt die Vermutung nahe, daß den Proteinen Nr. 1 bis 8 grundlegende Bedeutung zukommt.

## F. ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Typ (B-CLL) und das lymphoplasmazytoide Immunozytom (LPI) sind niedrig-maligne Non-Hodgkin-Lymphome, deren Abgrenzung durch Unterschiede in Klinik und Prognose begründet werden kann. In der Praxis stützt sich die Differentialdiagnose auf wenige gesicherte Befunde. In dieser Studie wird eine neue Unterscheidungshilfe vorgestellt. Es handelt sich hierbei um den Nachweis charakteristischer, reproduzierbarer Differenzen in der Proteinzusammensetzung zirkulierender Lymphozyten der B-CLL und des LPI. Mit hochauflösenden 2-D Gelelektrophorese-Techniken ließen sich bei der CLL einige Proteine nachweisen, die bei LPI nur in deutlich verminderter Menge vorlagen. Diese Proteine haben folgende Molekulargewichte und isoelektrische Punkte:

|      | MG       | pI  |
|------|----------|-----|
| Nr.1 | 77000 d; | 5.5 |
| Nr.2 | 75000 d; | 5.7 |
| Nr.3 | 74000 d; | 5.8 |
| Nr.4 | 51000 d; | 5.7 |
| Nr.5 | 59000 d; | 5.4 |
| Nr.6 | 57000 d; | 5.4 |
| Nr.7 | 56000 d; | 5.3 |

Umgekehrt fand sich bei den Immunozytomen ein zusätzliches Protein (Nr.8: MG = 27000 d; pI = 5.9), das bei der Hälfte der untersuchten B-CLL-Fälle abwesend war. Diese Befunde stützen die nicht unumstrittene Ansicht, daß es sich bei der B-CLL und dem LPI um verschiedene Krankheitsentitäten handelt.

Es wird gezeigt, daß die aufzutrennende Proteinmenge durch ein Proteinmeßverfahren standardisiert werden muß. In der von uns gewählten 2-dimensionalen Gelelektrophorese nach O'Farrell, die eine isoelektrische Fokussierung in der 1. Dimension und eine SDS-Gradientengel-Elek-

trophorese in der 2. Dimension kombiniert, dürfen nicht mehr als 200 µg zellulärer Gesamtproteine je Lauf eingesetzt werden, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen.

Weiter werden die 2-dimensionalen Proteinmuster anderer niedrig-maligner NHL-Zellen sowie normaler B- und T-Lymphozyten dargestellt. Durch Vergleich der dabei erhaltenen Befunde mit den Proteinmustern von B-CLL und LPI können die beschriebenen Differenzen unter Vorbehalt mit der Ableitung der Tumorzellen von verschiedenen Stufen der physiologischen B-Zell-Entwicklung in Beziehung gesetzt werden. Die funktionelle Bedeutung der betreffenden Proteine ist unklar. Es konnte jedoch sichergestellt werden, daß es sich bei ihnen nicht um Immunglobuline handelt.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aisenberg, A.C., Bloch, K.J.: Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. N.Engl.J.Med. 287: 272 - 276 (1972)
- 2) Bagley, C.M., DeVita, V.T., Berard, C.W., Canellos, G.P.: Advanced lymphosarcoma. Intensive cyclical combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine and prednisone. Ann.intern.Med. 76: 227 - 234 (1972)
- 3) Bach, J.F., Dormont, J., Dardenne, M., Balner, H.: In vitro rosette inhibition by antihuman antilymphocyte serum. Correlation with skin graft prolongation in subhuman primates. Transplantation 8: 265 - 280 (1969)
- 4) Basten, A., Miller, J.F.A.P., Sprent, J., Pye, J.: A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance. J.exp.Med. 135: 610 - 626 (1972)
- 5) Basten, A., Warner, N.L., Mandel, T.: A receptor for antibody on B lymphocytes. II. Immunochemical and electron microscopy characteristics. J.exp.Med. 135: 627 - 794 (1972)
- 6) Bennett, M.H., Farrer-Brown, G., Henry, K., Jelliffe, A.M.: Classification of non-Hodgkin's lymphomas (Letter to the Editor). Lancet 1974 II: 405 - 406
- 7) Berard, C.W., Cossman, J., Jaffe, E.S.: Malignant lymphomas as tumours of the immune system. Br.J.Cancer 42: 1 - 20 (1980)
- 8) Bianco, D., Patrick, R., Nussenzweig, V.: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. J.exp.Med. 132: 702 - 720 (1970)

- 9) Böyum,A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21: 1 - 109 (1968)
- 10) Bravo,R., Celis,J.E.: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of Hela cells. Cell Biology 84: 795 - 802 (1980)
- 11) Bravo,R., Celis,J.E.: Gene expression in normal and virally transformed mouse 3T3B and hamster BHK 21 cells. Exp.Cell Res. 127: 249 - 260 (1980)
- 12) Bremer,K.: Ätiologie und Pathogenese der Non-Hodgkin-Lymphome. In: Handbuch der Inneren Medizin, Zweiter Band, Teil 7, Non-Hodgkin-Lymphome (Hrsg.: Begemann,H.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 81 - 158 (1978)
- 13) Brittinger,G.: Histopathology and clinical problems in Non-Hodgkin lymphomas. Blut 43: 139 - 141 (1981)
- 14) Brittinger,G., Bartels,H., Bremer,K., Burger,A., Dühmke,E., Gunzer,U., König,E., Stacher,A., Stein,H., Theml,H., Waldner,R. (Kieler Lymphomgruppe): Retrospektive Untersuchungen zur klinischen Bedeutung der Kiel Klassifikation der malignen Non-Hodgkin-Lymphome. Strahlentherapie 153: 222 - 228 (1977)
- 15) Brittinger,G., Bartels,H., Burger,A., Dühmke,E., Fülle,H.H., Gunzer,U., Heinz,R., Huhn,D., Löhr,G.W., Musshoff,K., Nowicki,L., Pfoch,M., Pralle,H., Schmalhorst,U. (Kieler Lymphomgruppe): Grundlagen und bisherige Ergebnisse der prospektiven Studie der Kieler Lymphomgruppe über Non-Hodgkin-Lymphome. In: Stacher,A., Höcker,P. (Hrsg.): Lymphknotentumoren. Pathophysiologie, Klinik und Therapie. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore: 193 - 200 (1979)

- 16) Brittinger,G., Schmalhorst,U., Bartels,H., Fülle,H.H., Gerhartz,H., Gremmel,G., Grisar,T., Grupp,H.J., Gunzer, U., Huhn,D., Koeppen,K.-M., Kubanek,B., Leopold,H., Löffler,H., Löhr,G.W., Nowicki,L., Rühl,U., Schmidt,M., Stacher,A., Theml,H., Lennert,K. (Kiel Lymphoma Study Group): Principles and present status of a prospective multicenter study on the clinical relevance of the Kiel classification. Blut 43: 155 - 166 (1981)
- 17) Burnette,W.N.: "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio-iodinated protein A. Anal.Biochem. 112: 195 - 203 (1981)
- 18) Byrne,G.E.: Rappaport classification of non-Hodgkin's lymphoma: Histologic features and clinical significance. Cancer Treat.Rep. 61: 935 - 944 (1977)
- 19) Carbone,P.P., Kaplan,H.S., Musshoff,K., Smithers,D.W., Tubiana,M.: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Res. 31: 1860 - 1861 (1971)
- 20) DeVita,V.T., Canellos,G.P., Chabner,B.A., Schein,P.S., Hubbard,S., Young,R.C.: Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. Results with combination chemotherapy. Lancet 1975 I: 248 - 250.
- 21) Dickler,H.B., Siegal,F.P., Bentwich,Z.H., Kunkel,H.G.: Lymphocyte binding of aggregated IgG and surface Ig staining in chronic lymphocytic leukemia. Clin.Exp. Immunol. 14: 97 - 106 (1973)
- 22) Dorfman,R.F.: Classification of non-Hodgkin's lymphomas (Lettor to the Editor). Lancet 1974 I: 1295 - 1296.
- 23) Dorfman,R.F.: Classification of non-Hodgkin's lymphomas (Lettor to the Editor). Lancet 1974 II: 961 - 962.

- 24) Dutcher, T.F., Fahey, J.L.: Immunocytochemical demonstration of intranuclear localization of 18 S gamma macroglobulin in macroglobulinemia of Waldenström. *Proc. Soc. exper. Biol. (N.Y.)* 103: 452 - 455 (1960)
- 25) Fisher, R.I., DeVita, V.T., Jonson, B.L., Simon, R., Young, R.C.: Prognostic factors for advanced diffuse histiocytic lymphoma following treatment with combination chemotherapy. *Amer. J. Med.* 63: 177 - 182 (1977)
- 26) Fu, S.M., Chiorazzi, N., Kunkel, H.G., Halper, J.P., Harris, S.R.: Induction of in vitro differentiation and immunoglobulin synthesis of human leukemic B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 148: 1570 - 1578 (1978)
- 27) Gérard-Marchant, R., Hamlin, I., Lennert, K., Rilke, F., Stansfeld, A.G., Van Unnik, J.A.M.: Classification of non-Hodgkin's lymphomas (Letter to the Editor). *Lancet* 1974 II: 406 - 408.
- 28) Han, T., Ezdinki, E.Z., Shinaoka, K., Desai, D.V.: Chlorambucil vs. combined chlorambucil - corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 31: 502 - 508 (1973)
- 29) Heinz, R., Stacher, A., Pralle, H., Theml, H., Brunswicker, F., Burkert, M., Common, H., Fülle, H.H., Grisar, T., Grüneisen, A., Herrmann, F., Leopold, H., Liffers, R., Meusers, P., Nowicki, L., Nürnberger, R., Rengshausen, H., Rühl, U., Schoengen, A., Schmidt, M., Wirthmüller, R., Schwarze, E.-W., Brittinger, G.: Lymphoplasmacytic/lymphoplasmacytoid lymphoma: A clinical entity distinct from chronic lymphocytic leukemia? *Blut* 43: 183 - 192 (1981)
- 30) Herman, T.S., Jones, S.E.: Systematic re-staging in the management of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat. Rep.* 61: 1009 - 1015 (1977)

- 31) Hirsch,F.W., Bröckl,C., Bross,K.J., Dölken,G.:  
Characterization of lymphoid cells by two-dimensional  
mini gel electrophoresis of proteins. J.Cancer Res.  
Clin.Oncol. 105: 166 - 172 (1983)
- 32) Hodgkin,T.: On some morbid appearances of the absorbent  
glands and spleen. Med.-Chir.Trans. 17: 68 - 114 (1832)
- 33) Huhn,D.: Nicht-Hodgkin-Lymphome - einige aktuelle As-  
pekte der klinischen Diagnostik und Therapie. Klin.  
Wochenschr. 61: 435 - 443 (1983)
- 34) Huhn,D., Theml,H., Burg,G., Emmerich,B., Fink,U.,  
Hiller,E., Rohloff,R., Siegert,W., Thiel,E.: Maligne  
Lymphome. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie.  
Schriftenreihe des Tumorzentrums München, Demeter  
Verlag, Gräfelfing (1983)
- 35) Huhn,D., Thiel,E., Rodt,H.: Classification of normal  
and malignant lymphatic cells using acid phosphatase  
and acid esterase. Klin.Wochenschr. 58: 65 - 71 (1980)
- 36) Jaffe,E.S., Shevach,E.M., Frank,M.M., Berard,C.W.,  
Green,I.: Nodular lymphoma - evidence for origin from  
follicular B lymphocytes. N.Engl.J.Med. 290: 813 -  
819 (1974)
- 37) Janossy,G., Thomas,J.A., Pizzolo,G., Granger,S.M.,  
McLaughlin,J., Habeshaw,J.A., Stansfeld,A.G., Sloane,J.:  
Immuno-histological diagnosis of lymphoproliferative  
diseases by selected combinations of antisera and mono-  
clonal antibodies. Br.J.Cancer 42: 224 - 242 (1980)
- 38) Jones,S.E., Fuks,Z., Bull,M., Kadin,M.E., Dorfman,R.F.,  
Kaplan,H.S., Rosenberg,S.A., Kim,H.: Non-Hodgkin's  
lymphomas. IV.Clinicopathological correlation in 405  
cases. Cancer 31: 806 - 823 (1973)

- 39) Karpinski,A., Mottet,S., Krüger,G., Wustrow,J., Schumacher,K., Maerker-Alzer,G.: Korrelation zwischen Oberflächen- und intrazellulärem Immunglobulin (SIg, CIg) mit Blut-Immunglobulinspiegeln (BIg) bei lymphozytischen und lymphoplasmazytoiden Lymphomen. Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 64: 442 (1980)
- 40) Knospe,W.H., Loeb,V., Huguley,C.M.: Bi-weekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. Cancer 33: 555-562 (1974)
- 41) König,E., Bartels,H., Bremer,K., Burger-Schüler,A., Common,H., Dühmke,E., Engelhard,M., Fülle,H.H., Gunzer,U., Koeppen,K.-M., Leopold,H., Nowicki,L., Oertel,J., Paetzmann,S., Rühl,U., Schmidt,M., Schoengen,A., Scholle,H., Stacher,A., Wolf-Hornung,B., Schwarze,E.-W., Brittinger,G. (Kiel Lymphoma Study Group): Germinal center cell lymphomas: Prognostic significance of their histopathological differentiation. Blut 43: 193 - 200 (1981)
- 42) Koziner,B., Kempin,S., Passe,S., Gee,T., Good,R.A., Clarkson,B.D.: Characterization of B-cell leukemias: A tentative immunomorphological scheme. Blood 56: 815 - 823 (1980)
- 43) Krüger,G., Fischer,R.: Das maligne Non-Hodgkin-Lymphom. Übersicht der zur Zeit gebräuchlichen oder in der Diskussion befindlichen Klassifikationsschemata. Internist 21: 483 - 492 (1980)
- 44) Krüger,G.R.F., Grisar,T., Lennert,K., Schwarze,E.-W., Brittinger,G. (Kiel Lymphoma Study Group): Histopathological correlation of the Kiel with the original Rappaport classification of malignant non-Hodgkin lymphomas. Blut 43: 167 - 181 (1981)

- 45) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680 - 685 (1970)
- 46) Leavitt, J., Leavitt, A., Attallah, A.M.: Dissimilar modes of expression of  $\beta$ - and  $\gamma$ -Actin in normal and leukemic human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 4984 - 4987 (1980)
- 47) Leder, L.-D.: Der Blutmonozyt. Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik Bd. 23, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. New York (1967)
- 48) Lennert, K.: Classification of malignant lymphomas (European Concept). In: Progress in lymphology (Ed.: Rüttimann, A.); Thieme Verlag, Stuttgart, 103 - 109 (1967)
- 49) Lennert, K.: Follicular lymphoma. A tumor of the germinal centers. In: Akazaki, K., Rappaport, H., Berard, C.W., Bennett, J.M., Ishikawa, E. (eds.): Malignant diseases of the hematopoietic system. GANN Monograph on Cancer Res., Vol. 15, University of Tokyo Press, Tokyo, pp 217 - 231 (1973)
- 50) Lennert, K.: Klassifikation und Morphologie der Non-Hodgkin-Lymphome. In: Maligne Lymphome und monoklonale Gammopathien (Hrsg.: Löffler, H.). Hämatologie und Bluttransfusion, Vol. 18, Lehmann, München: 145 - 166 (1976)
- 51) Lennert, K.: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. In: Lennert, K., Mohri, N., Stein, H., Kaiserling, E. and Müller-Hermelink, H.K.: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 83 - 110 (1978)

- 52) Lennert,K., Mohri,N.: Histopathology and diagnosis of Non-Hodgkin's lymphomas. In: Lennert,K., Mohri,N., Stein,H., Kaiserling,E. and Müller-Hermelink,H.K.: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 111 - 469 (1978)
- 53) Lennert,K., Stein,H., Kaiserling,E.: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Brit.J.Cancer* 31: Suppl. II, 29 - 43 (1975)
- 54) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265 - 275 (1951)
- 55) Lukes,R.J., Collins,R.D.: A functional classification of malignant lymphomas. In: The Reticuloendothelial System (Eds.: Rébuck,J.W., Berard,C.W., Abell,M.R.). Monographs in Pathology, No. 16: 213 - 242. Williams and Wilkins, Baltimore (1975)
- 56) Man,N.T., Morris,G.E., Cole,R.J.: Two dimensional gel analysis of nuclear proteins during muscle differentiation in vitro. I.Changes in nuclear protein content. *Exp.Cell Res.* 126: 375 - 382 (1980)
- 57) Mc Kelvey,E.M., Gottlieb,J.A., Wilson,H.E., Haut,A., Talley,R.W., Stephens,R., Lane,M., Gamble,J.F., Jones,S.E., Grozea,P.N., Gutterman,J., Coltman,C., Moon,T.E.: Hydroxyldaunomycin (adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer* 38: 1484 - 1493 (1976)
- 58) Meugé,C., Hoerni,B., De Mascarel,A., Durand,M., Richard,P., Hoerni-Simon,G., Chauvergne,J., Lagarde,C.: Non-Hodgkin malignant lymphomas. Clinicopathologic correlations with the Kiel classification. Retrospective analysis of a series of 274 cases. *Eur.J.Cancer* 14: 587 - 592 (1978)

- 59) Mukherji,B., Yahoda,A., Oetigen,H.F., Krakoff,I.H.:  
Cyclic chemotherapy in lymphoma. Cancer 28: 886 - 893  
(1971)
- 60) Musshoff,K.: Voraussetzungen und Probleme der adjuvan-  
ten Chemotherapie in Verbindung mit der primären Strahl-  
entherapie der Nicht-Hodgkin-Lymphome unter besonderer  
Berücksichtigung der Histologie. In: Adjuvante zyto-  
statische Chemotherapie. Zytostatische Therapie als  
Rezidivprophylaxe? (Hrsg.: Huber,H., Senn,H.J.,  
Falkensammer,M.). Hämatol.Bluttransfus. 22: 101 - 114  
(1978)
- 61) Musshoff,K., Brücher,H.: Diagnostic and therapeutic  
problems in non-Hodgkin's lymphomas. Blut 43: 143 -  
154 (1981)
- 62) Nathwani,B.N.: A critical analysis of the classifica-  
tions of non-Hodgkin lymphomas. Cancer 44: 347 - 384  
(1979)
- 63) National Cancer Institute sponsored study of classifi-  
cations of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and de-  
scription of a working formulation for clinical usage.  
Cancer 49: 2112 - 2135 (1982)
- 64) O'Farrell,P.H.: High resolution two-dimensional elec-  
trophoresis of proteins. J.Biol.Chem. 250: 4007 -  
4021 (1975)
- 65) Pangalis,G.A., Nathwani,B.N., Rappaport,H.: Malignant  
lymphoma, well differentiated lymphocytic. Its rela-  
tionship with chronic lymphocytic leukemia and macro-  
globulinemia Waldenström. Cancer 39: 999 - 1010 (1977)
- 66) Portlock,C.S., Rosenberg,S.A.: No initial therapy for  
stage III and IV non-Hodgkin's lymphomas of favorable  
histiologic types. Ann.Intern.Med. 90: 10 - 13 (1979)

- 67) Preud-Homme, J.L., Seligmann, M.: Immunoglobulins on the surface of lymphoid cells in Waldenström's macroglobulinemia. *J.clin.Invest.* 51: 701 - 705 (1972)
- 68) Raff, M.C.: Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. *Immunology* 19: 637 - 650 (1970)
- 69) Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219 - 234 (1975)
- 70) Rappaport, H.: Tumors of the hematopoietic system. In: *Atlas of the tumor pathology, Sect. III, Fasc. 8.* US Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 91 - 156 (1966)
- 71) Rappaport, H., Winter, W.J., Hicks, E.B.: Follicular lymphoma. A reevaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer (Philad.)* 9: 792 - 821 (1956)
- 72) Reed, D.M.: On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp.Rep.* 10: 133 - 196 (1902)
- 73) Rosenberg, S.A.: Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat.Rep.* 61: 1023 - 1027 (1977)
- 74) Schamaun, M.: Zur pathologischen Anatomie der sog. Macroglobulinaemie Waldenstroem. *Schweiz.Z.allg. Path.* 17: 25 - 46 (1954)
- 75) Schwarze, E.-W., Radaszkiewicz, T., Pülhorn, G., Goos, M., Lennert, K.: Maligne und benigne Lymphome des Auges, der Lid- und Orbitalregion. *Virchows Arch.Pathol.Anat.* 370: 85 - 96 (1976)

- 76) Seligmann, M., Preud'Homme, J.L., Brouet, J.C.:  
B and T cell markers in human proliferative blood diseases and primary immunodeficiencies, with special reference to membrane bound immunoglobulins.  
Transplant.Rev. 16: 85 - 113 (1973)
- 77) Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biophys.Biochem. Res.Comm. 28: 815 - 820 (1967)
- 78) Stacher, A., Waldner, R., Thöml, H.: Klinik der malignen Non-Hodgkin-Lymphome der Kieler Klassifikation: Lymphoplasmazytoides Lymphom und chronisch lymphatische Leukämie. In: Maligne Lymphome und monoklonale Gammopathien (Hrsg.: Löffler, H.). Hämatologie und Bluttransfusion, Vol. 18, Lehmann, München: 199 - 209 (1976)
- 79) Stacher, A., Bartels, H., Bremer, K., Brunswicker, F., Common, H., Fülle, H.H., Gunzer, U., Leopold, H., Nowicki, L., Oerter, D., Pralle, H., Thöml, H., Waldner, R. (Kieler Lymphomgruppe): Klinik und Prognose der lymphoplasmazytoiden malignen Lymphome (Immunozytome). In: Stacher, A., Höcker, P. (Hrsg.): Lymphknotentumoren, Pathophysiologie, Klinik und Therapie. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore: 218 - 223 (1979)
- 80) Stein, H.: Immunochemische und immunzytologische Befunde bei Non-Hodgkin-Lymphomen. In: Maligne Lymphome und monoklonale Gammopathien (Hrsg.: Löffler, H.). Hämatologie und Bluttransfusion, Vol. 18, Lehmann, München: 167 - 183 (1976)
- 81) Stein, H.: The immunologic and immunochemical basis for the Kiel classification. In: Lennert, K., Mohri, N., Stein, H., Kaiserling, E., Müller-Hermelink, H.K.: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 529 - 657 (1978)

- 82) Stein,H.: Systematik der Non-Hodgkin-Lymphome. In: Handbuch der Inneren Medizin, Zweiter Band, Teil 7, Non-Hodgkin-Lymphome (Hrsg.: Begemann,H.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York: 1 - 79 (1982)
- 83) Sternberg,C.: Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. Zeitschr.Heilk. 19: 21 - 90 (1898)
- 84) Strauchen,J.A., Young,R.C., DeVita,V.T., Anderson,T., Fantone,J.C., Berard,C.W.: Clinical relevance of the histopathological subclassification of diffuse "histiocytic" lymphoma. N.Engl.J.Med. 299: 1382 - 1387 (1978)
- 85) Thelml,H., Burger,A., Keiditsch,E., Enne,W., Eggert,K., Dietzfelbinger,H., Gräff,L., Zsida,L.: Klinische Beobachtungen zur Charakterisierung des splenomegalen Immunozytoms. Med.Klin. 72: 1019 - 1032 (1977)
- 86) Virchow,R.: Weißes Blut. Neue Notizen aus dem Gebiet der Natur- und Heilkunde. Froriep's neue Notizen 36: 151 - 156 (1845)
- 87) Virchow,R.: Die krankhaften Geschwülste. Dreißig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin. Vol. 2, Hirschwald, Berlin (1865)
- 88) Waldenström,J.: Incipient myelomatosis or "essential" Hyperglobulinemia with fibrinogenopenia - A new syndrome? Acta.med.Scand. 117: 216 - 247 (1944)
- 89) Weber,K., Osborn,M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamid gel electrophoresis. J.Bio.Chem. 244: 4406 - 4412 (1969)

- 90) Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Hämatologie und Humangenetik, 8. Auflage, Ciba-Geigy Ltd., Basel, S. 68 (1979)
- 91) Zechel, K., Weber, K.: Degradation of nucleic acids in cell lysates by S1 Nuclease in the presence of 9 M urea and sodium dodecylsulfate. Eur.J.Biochem. 77: 133 - 139 (1977)
- 92) Zippin, C., Cutler, S.J., Reeves, W.J., Lum, D.: Survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood 42: 367 - 376 (1973)



## H. ABKÜRZUNGEN

### Lymphome:

|       |                                                         |
|-------|---------------------------------------------------------|
| NHL   | Non-Hodgkin-Lymphom                                     |
| mL    | malignant Lymphoma                                      |
| CLL   | Chronische lymphatische Leukämie                        |
| LPI   | Lymphoplasmazytisch/lymphoplasmazytoides<br>Immunozytom |
| PLL   | Prolymphozytäre Leukämie                                |
| HZL   | Haarzellen-Leukämie                                     |
| cb/cc | centroblastic/centrocytic                               |
| cc    | centrocytic                                             |
| DWDL  | diffuse well differentiated lymphocytic                 |
| DPDL  | diffuse poorly differentiated lymphocytic               |

### Chemikalien:

|       |                                        |
|-------|----------------------------------------|
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                   |
| PbS   | Phosphate buffered saline              |
| TCA   | Trichloressigsäure                     |
| FCS   | Fetales Kälberserum                    |
| BSA   | Rinderserumalbumin                     |
| NP-40 | Nonidet 40 (nicht ionisches Detergenz) |
| TEMED | N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin    |

### Einheiten:

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| d             | Dalton                                                      |
| x g           | Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ g/sec}^2$ ) |
| M             | Molar                                                       |
| mM            | Millimolar                                                  |
| ml            | Milliliter                                                  |
| $\mu\text{l}$ | Mikroliter                                                  |
| g             | Gramm                                                       |
| mg            | Milligramm                                                  |
| $\mu\text{g}$ | Mikrogramm                                                  |
| mm            | Millimeter                                                  |

|     |                       |
|-----|-----------------------|
| %   | Prozent               |
| w/v | Gewicht pro Volumen   |
| N   | Normal                |
| W   | Watt                  |
| A   | Ampere                |
| V   | Volt                  |
| h   | Stunde                |
| °C  | Grad Celsius          |
| pI  | Isoelektrischer Punkt |
| MG  | Molekulargewicht      |

Verschiedene Begriffe:

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| 2-D       | 2-dimensional                |
| SIg       | Surface Immunoglobulin       |
| CIg       | Cytoplasmatic Immunoglobulin |
| $\lambda$ | Lambda                       |
| $\kappa$  | Kappa                        |
| FcR       | Fragment C-Rezeptor          |
| C3R       | Rezeptor für Komplement C 3  |
| ER        | Erythrozyten-Rezeptor        |
| Hb        | Hämoglobin                   |
| PAS       | Perjodsäure-Schiff-Reaktion  |

## I. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herr Priv.-Doz. Dr. W. Siegert hat durch die Themenstellung und durch viele anregende Diskussionen, wichtige konstruktive Kritik und laufende wissenschaftliche Begleitung diese Arbeit ermöglicht. Ihm gilt mein besonderer Dank.

Für die Überlassung von Blutproben von Patienten gilt mein Dank im Klinikum Großhadern Herrn PD Dr. W. Siegert und im Klinikum rechts der Isar Herrn PD Dr. B. Emmerich. Die Bereitstellung von Schafserythrozyten verdanke ich Herrn PD Dr. E. Thiel.

Frau T. Mönch danke ich für die Unterstützung bei der Erlernung der Methodik und für viele anregende Gespräche, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



## LEBENS LAUF

Am 5. September 1957 wurde ich als erster Sohn des Arztes Helmut Zimmermann und seiner Ehefrau Helga, geborene Erwerth, in der Landeshauptstadt München geboren.

Von September 1963 bis Juli 1967 besuchte ich die Volksschule an der Tumblingerstrasse in München.

Im September 1967 trat ich in den humanistischen Zweig des Theresiengymnasiums in München ein. Dort legte ich am 25.6.1976 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1976/77 nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Medizin auf. Am 25.8.1978 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, am 30.8.1979 den Ersten Abschnitt, am 19.3.1982 den Zweiten Abschnitt und im April 1983 den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Am 5. Mai 1983 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Im Oktober 1980 begann ich an der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns) mit der vorliegenden Dissertationsschrift.









